

ENGLISH TRANSLATION OF

JP 7-327683

**Entitled: "DNA CORRESPONDING TO SPIKE PROTEIN GENE
RNA OF FELINE INFECTIOUS PERITONITIS I TYPE VIRUS"**

Cited in Information Disclosure Statement

Re: US Application Serial No.: 10/520,333
(US National Phase of PCT/JP03/08524)

Int'l Filing date: July 4, 2003

Attorney Docket No.: 082368-002100US

BEST AVAILABLE COPY

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 07-327683

(43)Date of publication of application : 19.12.1995

(51)Int.Cl.

C12N 15/09

A61K 39/215

C07K 14/165

C12P 21/02

// (C12P 21/02

C12R 1:19)

(21)Application number : 06-129300 (71)Applicant : KITASATO INST:THE

(22)Date of filing : 10.06.1994 (72)Inventor : KOYAMA HIROYUKI
HOUTATSU
TSUTOMU
HASHIMOTO
HIROSHI
AIZAWA CHIKARA

(54) DNA CORRESPONDING TO SPIKE PROTEIN GENE RNA OF FELINE INFECTIOUS PERTITONITIS I TYPE VIRUS

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain the subject new DNA for preventing infection of a feline infectious peritonitis I type virus and producing vaccine for treating and a reagent for diagnosis, corresponding to spike protein gene RNA of feline infectious peritonitis I type virus and having a specific base

[illegible]

sequence.

CONSTITUTION: This DNA

corresponding to spike protein gene

RNA of feline infectious peritonitis I

type virus has length of total length

or part of the base sequence and is

useful for producing vaccine capable

of preventing or treating infection of

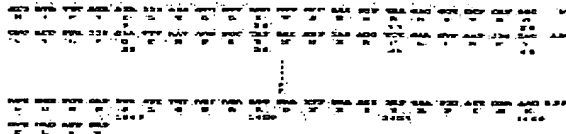
feline infectious peritonitis I type

virus being renal progressive viral infectious disease observed in many

animals of the family Felidae and showing lethal progress and reagents for

diagnosis. The DNA is obtained by cloning RNA recovered from feline

infectious peritonitis I type virus by a reverse transcriptase-PCR method.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 07.06.2001

[Date of sending the examiner's
decision of rejection]

[Kind of final disposal of application
other than the examiner's decision of
rejection or application converted
registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3565579

[Date of registration] 18.06.2004

[Number of appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of requesting appeal against
examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

*** NOTICES ***

JPO and NCIPi are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.**** shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] The following array [** 1]

```

ATG ATA TTC ATA ATA CTT ACA CTC CTT AGC GTT GCC AAG TCT GAA GAC GCT CCT CAT GGT 60
M I F I I L T L L S V A K S E D A P H G
5 10 15 20
GTC ACC TTA CCC CAA TTT AAT ACG TCC CAT AAC AAT GAA AGG TTT GAA CTT AAT TTC TAC 120
V T L P Q F N T S H N N E R F E L N F Y
25 30 35 40
AAT TTC TTA CAA ACT TGG GAT ATA CCA CCA AAC ACA GAA ACC ATT CTA GGA GGT TAT CTG 180
N F L Q T W D I P P N T E T I L G G Y L
45 50 55 60
CCT TAT TGT GGA GCA GGG GTT AAT TGT GGG TGG TAT AAT TTT AGT CAA AGT GTG GGA CAA 240
P Y C G A G V N C G W Y N F S Q S V G Q
65 70 75 80
AAT GGT AAG TAT GCC TAC ATA AAC ACG CAA AAT CTG AAT ATA CCG AAC GTT CAT GGC GTC 300
N G K Y A Y I N T Q N L N I P N V H G V
85 90 95 100
TAT TTT GAC GTA AGA GAA CAT AAT AAT GAC GGT GAG TGG GAT GAT CGT GAT AAA GTT GGC 360
Y F D V R E H N N D G E W D D R D K V G
105 110 115 120
CTA TTG ATT GCT ATA CAT GGC AAC TCG AAG TAT AGT TTG CTT ATG GTT TTG CAG GAT GCT 420
L L I A I H G N S K Y S L L M V L Q D A
125 130 135 140
GTG GAA GCT AAT CAG CCC CAT GTT GCT GTT AAA ATT TGC CAT TGG AAG CCA GGT AAC ATA 480
V E A N Q P H V A V K I C H W K P G N I
145 150 155 160
AGT TCT TAT CAC GCG TTT AGT GTA AAT CTA GGA GAT GGT GGT CAA TGC GTG TTT AAT CAG 540
S S Y H A F S V N L G D G G Q C V F N Q
165 170 175 180
AGA TTT TCA TTG GAC ACC GTA TTG ACA ACT AAT GAC TTC TAT GGC TTC CAG TGG ACT GAC 600
R F S L D T V L T T N D F Y G F Q W T D
185 190 195 200
ACC TAT GTT GAT ATC TAT CTA GGT GGC ACT ATT ACT AAA GTG TGG GTT GAC AAT GAT TGG 660
T Y V D I Y L G G T I T K V W V D N D W
205 210 215 220
AGC ATT GTT GAA GCT AGC ATC TCC TAT CAT TGG AAT CGG ATT AAC TAT GGA TAT TAC ATG 720
S I V E A S I S Y H W N R I N Y G Y Y N
225 230 235 240
CAA TTT GTT AAT CGC ACC ACT TAT TAT TAT GCG TAT AAT AAT ACT GGT GGT GCA AAT TAC ACA 780
Q F V N R T T Y Y A Y N N T G G A N Y T
245 250 255 260
CAA TTG CAG TTA AGC GAA TGC CAT ACT GAT TAT TGT GCT GGC TAT GCT AAG AAT GTC TTT 840
Q L Q L S E C H T D Y C A G Y A K N V F
265 270 275 280
GTG CCT ATA GAT GGT AAA ATA CCA GAA GAC TTC TCC TTT AGT AAC TGG TTT TTA TTG TCA 900
V P I D G K I P E D F S F S N W F L L S
285 290 295 300
GAT AAA TCC ACT TTG GTA CAA GGT CGT GTT CTT AGT AGT CAA CCA GTT TTT GTA CAA TGC 960
D K S T L V Q G R V L S S Q P V F V Q C
305 310 315 320
CTT AGG CCT GTA CCA TCG TGG TCT AAC AAT ACG GCT GTG GTG CAT TTT AAA AAT GAT GCC 1020
L R P V P S W S N T A V V H F K N D A
325 330 335 340
TTC TGC CCT AAC GTC ACG GCA GAT GTT TTG AGG TTC AAT CTA AAT TTT AGT GAC ACT GAT 1080
F C P N V T A D V L R F N L N F S D T D
345 350 355 360
GTC TAT ACA GAT TCA ACT AAT GAT GAA CAG TTG TTT TTT ACA TTT GAA GAT AAT ACA ACT 1140
V Y T D S T N D E Q L F P T F E D N T T
365 370 375 380
GCC TCC ATA GCC TGT TAT AGC AGT GCC AAT GTC ACT GAT TTT CAG CCT GCA AAT AAT AGT 1200
A S I A C Y S S A N V T D F Q P A N N S
385 390 395 400

```

[Formula 2]

```

GTC TCT CAC ATT CCA TTT GGC AAA ACT GCG CAT TTC TGT TTT GCC AAT TTT TCT CAT TCA 1206
V S H I P F G K T A H F C F A N F S H S
405 410 415 420
ATT GTG AGC AGA CAG TTT TTG GGC ATA CTT CCA CCA ACT GTT CGA GAG TTT GCA TTT GGC 1320
I V S R Q F L G I L P P T V R E F A F G
425 430 435 440
AGA GAT GGA TCC ATT TTT GTC AAT GGC TAT AAA TAT TTT AGT TTA CCA GCT ATC AGG AGT 1380
R D G S I F V N G Y K Y F S L P A I R S
445 450 455 460
GTT AAC TTC TCC ATC AGT TCA GTA GAG GAG TAT GGC TTT TGG ACC ATA GCC TAT ACT AAC 1440
V N F S I S S V E E Y G F W T I A Y T N
465 470 475 480
TAT ACA GAT GTA ATG GTG GAT GTT AAT GGC ACA GCT ATT ACT AGG CTA TTC TAT TGT GAC 1500
Y T D V M V D V H G T A I T R L F Y C D
485 490 495 500
TCG CCC CTC AAT AGA ATT AAG TGT CAA CAA TTA AAG CAT GAA TTG CCA GAC GGG TTT TAT 1560
S P L N R I K C Q Q L K H E L P D G F Y
505 510 515 520
TCT GCT AGT ATG CTT GTT AAA AAG GAT TTA CCC AAG ACA TTT GTT ACC ATG CCA CAG TTT 1620
S A S M L V K K D L P K T F V T M P Q F
525 530 535 540
TAC CAC TGG ATG AAT GTC ACG TTA CAT GTT GTA TTA AAT GAC ACA GAG AAA AAG TAT GAC 1680
Y H W M N V T L H V V L N D T E K K Y D
545 550 555 560
ATC ATT CTC GCT AAA GCC CCT GAG CTA GCA GCA CTC GCG GAT GTA CAT TTT GAA ATA GCT 1740
I I L A K A P E L A A L A D V H F E I A
565 570 575 580
CAG GCT AAC GGC AGT GTA ACT AAT GTT ACT AGC CTA TGT GTC CAA GCA AGA CAG TTG GCT 1800
Q A N G S V T N V T S L C V Q A R Q L A
585 590 595 600
CTA TTT TAT AAG TAT ACT AGC TTA CAA GGT TTG TAT ACT TAT TCT AAC TTA GTG GAG CTA 1860
L F Y K Y T S L Q G L Y T Y S N L V E L
605 610 615 620
CAA AAT TAT GAC TGC CCC TTC TCA CCG CAG CAG TTT AAT AAT TAT TTG CAG TTT GAA ACT 1920
Q N I D C P F S P Q Q F N N Y L Q F E T
625 630 635 640
TTA TGT TTT GAT GTG AAC CCT GCT GTG GCA GGT TGT AAG TGG TCG TTA GTT CAT GAT GTC 1980
L C F D V N P A V A G C K W S L V H D V
645 650 655 660
CAG TGG CGT ACG CAG TTC GCC ACC ATT ACG GTT TCT TAT AAA CAT GGT TCT ATG ATC ACT 2040
Q W R T Q F A T I T V S Y K H G S M I T
665 670 675 680
ACC CAT GCC AAG GGG CAC AGT TGG GGT TTT CAA GAT ACC TCT GTT TTG GTA AAA GAT GAA 2100
T H A K G H S W G F Q D T S V L V K D E
685 690 695 700
TGT ACT GAC TAC AAT ATA TAT GGC TTT CAG GGC ACA GGC ATT ATT AGA AAC ACC ACC TCA 2160
C T D Y N I Y G F Q G T G I I R H T T S
705 710 715 720
AGG TTA GTG GCT GGT CTT TAC TAC ACA TCT ATT AGT GGT GAC CTT CTA GCC TTT AAA AAT 2220
R L V A G L Y Y T S I S G D L L A F K N
725 730 735 740
AGT ACT ACT GGT GAG ATT TTC ACT GTA GTG CCA TGT GAT CTA ACA GCA CAA GTA GCT GTG 2280
S T T G E I F T V V P C D L T A Q V A V
745 750 755 760
ATT AAT GAT CAG ATA GTG GGA GCT ATA ACA GCC GTT AAT CAA ACT GAT CTG TTT GAG TTC 2340
I N D E I V G A I T A V N Q T D L F E F
765 770 775 780
GTA AAT AAC ACA CAG GCG AGA AGA TCA CGT AGT TCA ACA CCA AAT TTT GTA ACA TCC TAT 2400
V N N T Q A R R S R S S T P N F V T S Y
785 790 795 800

```

[Formula 3]

```

ACT ATG CCA CAA TTT TAT TAC ATA ACA AAA TGG AAT AAT GAC ACA TCG TCC AAT TGT ACA 2460
T M P Q F Y Y I T K W N N D T S S N C T
805 810 815 820
TCT GCC ATT ACC TAC TCC TCT TTT GCT ATT TGT AAT ACT GGT GAG ATT AAA TAT GTT AAT 2520
S A I T Y S S F A I C N T G E I K Y V N
825 830 835 840
GTC ACT CAT GTT GAA ATT GTG GAT GAT AGT ATA GGC GTT ATT AAA CCT GTT TCA ACA GGT 2580
V T H V E I V D D S I G V I K P V S T G
845 850 855 860
AAC ATA TCG ATA CCT AAA AAC TTC ACT GTC GCA GTA CAA GCT GAA TAC ATT CAG ATT CAA 2640
N I S I P K N F T V A V Q A E Y I Q I Q
865 870 875 880
GTC AAA CCT GTT GTT GTG GAT TGT GCC ACG TAT GTT TGT AAT GGC AAT ACA CAT TGC CTC 2700
V K P V V V D C A T Y V C N G N T H C L
885 890 895 900
AAA TTA CTA ACA CAA TAC ACC TCA GCT TGT CAG ACA ATT GAA AAT GCC CTT AAT CTT GGT 2760
K L L T Q I T S A C Q T I E N A L N L G
905 910 915 920
GCA CGT CTT GAA TCG TTA ATG CTT AAT GAT ATG ATT ACA GTA TCA GAT CGT GGT TTG GAG 2820
A R L E S L M L N D M I T V S D R G L E
925 930 935 940
CTT GCA ACT GTT GAA AGA TTC AAT GCC ACA GCT TTA GGT GGT GAA AAG CTA GGC GGT TTA 2880
L A T V E R F N A T A L G G E K L G G L
945 950 955 960
TAT TTT GAT GGC CTG AGC AGT CTA TTA CCG CCT AAA ATT GGT AAG AGG TCG GCT GTT GAA 2940
Y F D G L S S L L P P K I G K R S A V E
965 970 975 980
GAT CTA TTG TTC AAT AAA GTG GTG ACC AGC GGT CTT GGC ACT GTT GAT GAT GAC TAT AAA 3000
D L L F N K V V T S G L G T V D D D Y K
985 990 995 1000
AAG TGC TCT TCC GGC ACT GAC GTT GCA GAT CTA GTT TGT GCC CAA TAT TAC AAT GGC ATA 3060
K C S S G T D V A D L V C A Q Y I N G I
1005 1010 1015 1020
ATG GTT TTA CCT GGT GTT GTG GAT GGT AAT AAG ATG TCT ATG TAC ACT GCA TCT TTA ATT 3120
M V L P G V V D G N K M S N Y T A S L I
1025 1030 1035 1040
GGC GGT ATG GCT TTG GGC TCT ATT ACA TCC GCT GTA GCT GTT CCT TTC GCC ATG CAA GTG 3180
G G M A L G S I T S A V A V P F A M Q V
1045 1050 1055 1060
CAG GCG AGG CTT AAT TAT GTC GCA CTA CAA ACT GAT GTT TTG CAG GAG AAC CAA AAA ATA 3240
Q A R L N Y V A L Q T D V L Q E N Q K I
1065 1070 1075 1080
CTT GCT AAT GCC TTT AAT AAT GCC ATT GGT AAC ATT ACA CTA GCG CTT GGA AAA GTT TCT 3300
L A N A P N N A I G N I T L A L G K V S
1085 1090 1095 1100
AAT GCT ATT ACA ACC ACA TCA GAT GGT TTT AAT AGT ATG GCC TCA GCA CTG ACT AAG ATC 3360
N A I T T T S D G F N S M A S A L T K I
1105 1110 1115 1120
CAG AGT GTA GTC AAT CAA CAG GGT GAA GCG TTA AGT CAA CTT ACT AGT CAG TTA CAG AAG 3420
Q S V V N Q Q G E A L S Q L T S Q L Q K
1125 1130 1135 1140
AAC TTT CAG GCT ATC AGC AGT TCC ATT GCT GAA ATT TAT AAT AGG CTG GAG AAG GTG GAA 3480
N F Q A I S S S I A E I Y N R L E K V E
1145 1150 1155 1160
GCT GAT GCC CAA GTT GAC CGT CTC ATT ACT GGT AGA TTG GCA GCA CTT AAT GCT TAT GTG 3540
A D A Q V D R L I T G R L A A L N A Y V
1165 1170 1175 1180
TCT CAA ACT CTA ACT CAG TAT GCT GAA GTC AAG GCC AGT AGC CAA ATT GCA TTG GAG AAA 3600
S Q T L T Q Y A E V K A S R Q I A L E K
1185 1190 1195 1200

```

[Formula 4]

```

GTT AAT GAG TGT GTG AAA TCA CAA TCG AAT AGG TAT GGC TTC TGT GGA AAT GGA ACA CAC 3660
V  N  E  C  V  K  S  Q  S  N  R  Y  G  F  C  G  N  G  T  H
      1205              1210              1215              1220
CTA TTC TCA CTT GTC AAT TCA GCA CCT GAA GGT TTG CTT TTC TTT CAC ACA GTT TTA CTT 3720
L  F  S  L  V  N  S  A  P  E  G  L  L  F  F  H  T  V  L  L
      1225              1230              1235              1240
CCT ACA GAA TGG GAA GAA GTG ACG GCA TGG TCA GGA ATA TGT GTT AAT GAT ACT TAT GCA 3780
P  T  E  W  E  E  V  T  A  W  S  G  I  C  V  N  D  T  Y  A
      1245              1250              1255              1260
TAT GTG TTG AAA GAT TTT GAT CAT TCC ATT TTC AGC TAC AAT GGC ACG TAT ATG GTA ACT 3840
Y  V  L  K  D  F  D  H  S  I  F  S  Y  N  G  T  Y  M  V  T
      1265              1270              1275              1280
CCT CGT AAC ATG TTT CAA CCT AGA AAG CCT CAG ATG AGT GAT TTC GTG CAA ATT ACG AGT 3900
P  R  N  M  F  Q  P  R  K  P  Q  M  S  D  F  V  Q  I  T  S
      1285              1290              1295              1300
TGT GAA GTG ACT TTT TTG AAC ATG ACA TAT ACG ACA TTT CAG GAG ATT GTG ATC GAT TAT 3960
C  E  V  T  F  L  N  M  T  Y  T  T  F  Q  E  I  V  I  D  Y
      1305              1310              1315              1320
ATT GAT ATT AAC AAG ACT ATC GCT GAT ATG CTT GAA CAA TAC AAT CCT AAT TAC ACA ACT 4020
I  D  I  N  K  T  I  A  D  M  L  E  Q  Y  N  P  N  Y  T  T
      1325              1330              1335              1340
CCT GAG CTA AAT CTA CTG CTG GAT ATC TTT AAT CAG ACA AAG TTA AAC CTC ACT GCA GAA 4080
P  E  L  N  L  L  L  D  I  F  N  Q  T  K  L  N  L  T  A  E
      1345              1350              1355              1360
ATA GAC CAA TTG GAA CAA AGA GCT GAC AAC CTC ACT ACT ATA GCA CAT GAG CTA CAG CAG 4140
I  D  Q  L  E  Q  R  A  D  N  L  T  T  I  A  H  E  L  Q  Q
      1365              1370              1375              1380
TAC ATT GAC AAT CTT AAT AAG ACG CTT GTT GAC CTT GAC TGG CTC AAC AGG ATT GAA ACT 4200
Y  I  D  N  L  N  K  T  L  V  D  L  D  W  L  N  R  I  E  Y
      1385              1390              1395              1400
TAT GTA AAA TGG CCT TGG TAT GTG TGG TTA CTA ATA GGT TTA GTA GTA GTC TTC TGC ATA 4260
Y  V  K  W  P  W  Y  V  W  L  L  I  G  L  V  V  V  F  C  I
      1405              1410              1415              1420
CCA CTG TTA CTG TTT TGC TGT CTG AGT ACT GGT TTC TGT GGC TGT TTT GGT TGT GTT GGC 4320
P  L  L  L  F  C  C  L  S  T  G  F  C  G  C  F  G  C  V  G
      1425              1430              1435              1440
AGT TGT TOT CAT TCT CTT TGT AGT AGA AGG CAA TTT GAA ACC TAT GAA CCC ATT GAA AAG 4380
S  C  C  H  S  L  C  S  R  R  Q  F  E  T  Y  E  P  I  E  K
      1445              1450              1455              1460
GTT CAC ATT CAT
V  H  I  H

```

DNA corresponding to the spike protein gene RNA of the cat infectivity peritonitis I-beam virus which is alike and is characterized by having the overall length of the base sequence, or a part of the length in DNA corresponding to the spike protein gene RNA of a cat infectivity peritonitis I-beam virus shown.

[Claim 2] The following array [** 5]

```

ATG ATA TTC ATA ATA CTT ACA CTC CTT AGC GTT GCC AAG TCT GAA GAC GCT CCT CAT GGT 60
M I P I I L T L L S V A K S E D A P H G
5 10 15 20
GTC ACC TTA CCC CAA TTT AAT ACG TCC CAT AAC AAT GAA AGG TTT GAA CTT AAT TTC TAC 120
V T L P Q F N T S H N N E R F E L N F Y
25 30 35 40
AAT TTC TTA CAA ACT TGG GAT ATA CCA CCA AAC ACA GAA ACC ATT CTA GGA GGT TAT CTG 180
N F L Q T W D I P P N T E T I L G G Y L
45 50 55 60
CCT TAT TGT GGA GCA GGG GTT AAT TGT GGG TGG TAT AAT TTT AGT CAA AGT GTG GGA CAA 240
P Y C G A G V N C G W Y N F S Q S V G Q
65 70 75 80
AAT GGT AAG TAT GCC TAC ATA AAC ACG CAA AAT CTG AAT ATA CCG AAC GTT CAT GGC GTC 300
N G K Y A Y I N T Q N L N I P N V H G V
85 90 95 100
TAT TTT GAC GTA AGA GAA CAT AAT AAT GAC GGT GAG TGG GAT GAT CGT GAT AAA GTT GGC 360
Y F D V R E H N N D G E W D D R D K V G
105 110 115 120
CTA TTG AAT GCT ATA CAT GGC AAC TCG AAG TAT AGT TTG CTT ATG GTT TTG CAG GAT GCT 420
L L I A I H G N S K Y S L L M V L Q D A
125 130 135 140
GTG GAA GCT AAT CAG CCC CAT GTT GCT GTT AAA ATT TGC CAT TGG AAG CCA GGT AAC ATA 480
V E A N Q P H V A V K I C H W K P G N I
145 150 155 160
AGT TCT TAT CAC GCG TTT AGT GTA AAT CTA GGA GAT GGT GGT CAA TGC GTG TTT AAT CAG 540
S S Y H A F S V N L G D G G Q C V F N Q
165 170 175 180
AGA TTT TCA TTG GAC ACC GTA TTG ACA ACT AAT GAC TTC TAT GGC TTC CAG TGG ACT GAC 600
R F S L D T V L T T N D F Y G F Q W T D
185 190 195 200
ACC TAT GTT GAT ATC TAT CTA GGT GGC ACT ATT ACT AAA GTG TGG GTT GAC AAT GAT TGG 660
T Y V D I Y L G G T I T K V W V D N D W
205 210 215 220
AGC ATT GTT GAA GCT AGC ATC TCC TAT CAT TGG AAT CGG ATT AAC TAT GGA TAT TAC ATG 720
S I V E A S I S Y H W N R I N Y G Y Y M
225 230 235 240
CAA TTT GTT AAT CGC ACC ACT TAT TAT GCG TAT AAT AAT ACT GGT GGT GCA AAT TAC ACA 780
Q F V N R T T Y Y A Y N H T G G A N Y T
245 250 255 260
CAA TTG CAG TTA AGC GAA TGC CAT ACT GAT TAT TGT GCT GGC TAT GCT AAG AAT GTC TTT 840
Q L Q L S E C H T D Y C A G Y A K N V F
265 270 275 280
GTG CCT ATA GAT GGT AAA ATA CCA GAA GAC TTC TCC TTT AGT AAC TGG TTT TTA TTG TCA 900
V P I D G K I P E D F S F S N W F L L S
285 290 295 300
GAT AAA TCC ACT TTG GTA CAA GGT CGT GTT CTT AGT AGT CAA CCA GTT TTT GTA CAA TGC 960
D K S T L V Q G R V L S S Q P V F V Q C
305 310 315 320
CTT AGG CCT GTA CCA TCG TGG TCT AAC AAT ACG GCT GTG GTG CAT TTT AAA AAT GAT GCC 1020
L R P V P S W S N N T A V V H F K N D A
325 330 335 340
TTC TGC CCT AAC GTC ACG GCA GAT GTT TTG AGG TTC AAT CTA AAT TTT AGT GAC ACT GAT 1080
F C P N V T A D V L R F N L N F S D T D
345 350 355 360
GTC TAT ACA GAT TCA ACT AAT GAT GAA CAG TTG TTT TTT ACA TTT GAA GAT AAT ACA ACT 1140
V Y T D S T N D E Q L F F T F E D N T T
365 370 375 380
GCC TCC ATA GCC TGT TAT AGC AGT GCC AAT GTC ACT GAT TTT CAG CCT GCA AAT AAT AGT 1200
A S I A C Y S S A N V T D F Q P A N N S
385 390 395 400

```

[Formula 6]

```

GTC TCT CAC ATT CCA TTT GGC AAA ACT GCG CAT TTC TGT TTT GCC AAT TTT TCT CAT TCA 1206
V S H I P F G K T A H F C F A N F S H S
405 410 415 420
ATT GTG AGC AGA CAG TTT TTG GGC ATA CTT CCA CCA ACT GTT CGA GAG TTT GCA TTT GGC 1320
I V S R Q F L G I L P P T V R E F A F G
425 430 435 440
AGA GAT GGA TCC ATT TTT GTC AAT GGC TAT AAA TAT TTT AGT TTA CCA GCT ATC AGG AGT 1380
R D G S I F V N G Y K Y F S L P A I R S
445 450 455 460
GTT AAC TTC TCC ATC AGT TCA GTA GAG GAG TAT GGC TTT TGG ACC ATA GCC TAT ACT AAC 1440
V N F S I S S V E E Y G F W T I A Y T N
465 470 475 480
TAT ACA GAT GTA ATG GTG GAT GTT AAT GGC ACA GCT ATT ACT AGG CTA TTC TAT TGT GAC 1500
Y T D V M V D V N G T A I T R L F Y C D
485 490 495 500
TCG CCC CTC AAT AGA ATT AAG TGT CAA CAA TTA AAG CAT GAA TTG CCA GAC GGG TTT TAT 1560
S P L N R I K C Q L K H E L P D G F Y
505 510 515 520
TCT GCT AGT ATG CTT GTT AAA AAG GAT TTA CCC AAA ACA TTT GTT ACC ATG CCA CAG TTT 1620
S A S M L V K K D L P K T F V T M P Q F
525 530 535 540
TAC CAC TGG ATG AAT GTC ACG TTA CAT GTT GTA TTA AAT GAC ACA GAG AAA AAG TAT GAC 1680
Y H W M N V T L H V V L N D T E K K Y D
545 550 555 560
ATC ATT CTC GCT AAA GCC CCT GAG CTA GCA GCA CTC GCG GAT GTA CAT TTT GAA ATA GCT 1740
I I L A K A P E L A A L A D V H F E I A
565 570 575 580
CAG GCT AAC GGC AGT GTA ACT AAT GTT ACT AGC CTA TGT GTC CAA GCA AGA CAG TTG GCT 1800
Q A N G S V T N V T S L C V Q A R Q L A
585 590 595 600
CTA TTT TAT AAG TAT ACT AGC TTA CAA GGT TTG TAT ACT TAT TCT AAC TTA GTG GAG CTA 1860
L F Y K Y T S L Q G L Y T Y S N L V E L
605 610 615 620
CAA AAT TAT GAC TGC CCC TTC TCA CCG CAG CAG TTT AAT AAT TAT TTG CAG TTT GAA ACT 1920
Q N Y D C P F S P Q Q F N N Y L Q F E T
625 630 635 640
TTA TGT TTT GAT GTG AAC CCT GCT GTG GCA GGT TGT AAG TGG TCG TTA GTT CAT GAT GTC 1980
L C F D V N P A V A G C K W S L V H D V
645 650 655 660
CAG TGG CGT ACG CAG TTC GCC ACC ATT ACG GTT TCT TAT AAA CAT GGT TCT ATG ATC ACT 2040
Q W R T Q F A T I T V S Y K H G S M I T
665 670 675 680
ACC CAT GCC AAG GGG CAC AGT TGG GGT TTT CAA GAT ACC TCT GTT TTG GTA AAA GAT GAA 2100
T H A K G H S W G F Q D T S V L V K D E
685 690 695 700
TGT ACT GAC TAC AAT ATA TAT GGC TTT CAG GGC ACA GGC ATT ATT AGA AAC ACC ACC TCA 2160
C T D Y N I Y G F Q G T G I I R N T T S
705 710 715 720
AGG TTA GTG GCT GGT CTT TAC TAC ACA TCT ATT AGT GGT GAC CTT CTA GCC TTT AAA AAT 2220
R L V A G L Y Y T S I S G D L L A F K N
725 730 735 740
AGT ACT ACT GGT GAG ATT TTC ACT GTA GTG CCA TGT GAT CTA ACA GCA CAA GTA GCT GTG 2280
S T T G E I F T V V P C D L T A Q V A V
745 750 755 760
ATT AAT GAT GAG ATA GTG GGA GCT ATA ACA GCC GTT AAT CAA ACT GAT CTG TTT GAG TTC 2340
I N D E I V G A I T A V N Q T D L F E F
765 770 775 780
GTA AAT AAC ACA CAG CCG AGA AGA TCA CGT AGT TCA ACA CCA AAT TTT GTA ACA TCC TAT 2400
V N N T Q A R R S R S S T P N F V T S Y
785 790 795 800

```

[Formula 7]

ACT ATG CCA CAA TTT TAT TAC ATA ACA AAA TGG AAT AAT GAC ACA TCG TCC AAT TGT ACA 2460
T M P Q F Y Y I T K W N N D T S S N C T
805 810 815 820

TCT GCC ATT ACC TAC TCC TCT TTT GCT ATT TGT AAT ACT GGT GAG ATT AAA TAT GTT AAT 2520
S A I T Y S S F A I C N T G E I K Y V N
825 830 835 840

GTC ACT CAT GTT GAA ATT GTG GAT GAT AGT ATA GGC GTT ATT AAA CCT GTT TCA ACA GGT 2580
V T H V E I V D D S I G V I K P V S T G
845 850 855 860

AAC ATA TCG ATA CCT AAA AAC TTC ACT GTC GCA GTA CAA GCT GAA TAC ATT CAG ATT CAA 2640
N I S I P K N F T V A V Q A E Y I Q I Q
865 870 875 880

GTC AAA CCT GTT GTT GTG GAT TGT GCC ACG TAT GTT TGT AAT GGC AAT ACA CAT TGC CTC 2700
V K P V V V D C A T Y V C N G N T H C L
885 890 895 900

AAA TTA CTA ACA CAA TAC ACC TCA GCT TGT CAG ACA ATT GAA AAT GCC CTT AAT CTT GGT 2760
K L L T Q Y T S A C Q T I E N A L N L G
905 910 915 920

GCA CGT CTT GAA TCG TTA ATG CTT AAT GAT ATG ATT ACA GTA TCA GAT CGT GGT TTG GAG 2820
A R L E S L M L N D M I T V S D R G L E
925 930 935 940

CTT GCA ACT GTT GAA AGA TTC AAT GCC ACA GCT TTA GGT GGT GAA AAG CTA GGC GGT TTA 2880
L A T V E R F N A T A L G G E K L G G L
945 950 955 960

TAT TTT GAT GGC CTG AGC AGT CTA TTA CCG CCT AAA ATT GGT AAG AGG TCG GCT GTT GAA 2940
Y F D G L S S L L P P K I G K R S A V E
965 970 975 980

GAT CTA TTG TTC AAT AAA GTG GTG ACC AGC GGT CTT GGC ACT GTT GAT GAT GAC TAT AAA 3000
D L L F N K V V T S G L G T V D D D Y K
985 990 995 1000

AAG TGC TCT TCC GGC ACT GAC GTT GCA GAT CTA GTT TGT GCC CAA TAT TAC AAT GGC ATA 3060
K C S S G T D V A D L V C A Q Y I N G I
1005 1010 1015 1020

ATG GTT TTA CCT GGT GTT GTG GAT GGT AAT AAG ATG TCT ATG TAC ACT GCA TCT TTA ATT 3120
M V L P G V V D G N K M S M Y T A S L I
1025 1030 1035 1040

GGC GGT ATG GCT TTG GGC TCT ATT ACA TCC GCT GTA GCT GTT CCT TTC GCC ATG CAA GTG 3180
G G N A L G S I T S A V A V P F A M Q V
1045 1050 1055 1060

CAG GCG AGG CTT AAT TAT GTC GCA CTA CAA ACT GAT GTT TTG CAG GAG AAC CAA AAA ATA 3240
Q A R L N Y V A L Q T D V L Q E N Q K I
1065 1070 1075 1080

CTT GCT AAT GCC TTT AAT AAT GCC ATT GGT AAC ATT ACA CTA GCG CTT GGA AAA GTT TCT 3300
L A N A F N N A I G N I T L A L G K V S
1085 1090 1095 1100

AAT GCT ATT ACA ACC ACA TCA GAT GGT TTT AAT AGT ATG GCC TCA GCA CTG ACT AAG ATC 3360
N A I T T T S D G F N S M A S A L T K I
1105 1110 1115 1120

CAG AGT GTA GTC AAT CAA CAG GGT GAA GCG TTA AGT CAA CTT ACT AGT CAG TTA CAG AAG 3420
Q S V V N Q Q G E A L S Q L T S Q L Q K
1125 1130 1135 1140

AAC TTT CAG GCT ATC AGC AGT TCC ATT GCT GAA ATT TAT AAT AGG CTG CAG AAG GTG GAA 3480
N F Q A I S S S I A E I Y N R L E K V E
1145 1150 1155 1160

GCT GAT GCC CAA GTT GAC CGT CTC ATT ACT GGT AGA TTG GCA GCA CTT AAT GCT TAT GTG 3540
A D A Q V D R L I T G R L A A L N A Y V
1165 1170 1175 1180

TCT CAA ACT CTA ACT CAG TAT GCT GAA GTC AAG GCC ACT AGC CAA ATT GCA TTG GAG AAA 3600
S Q T L T Q I A E V K A S R Q I A L E K
1185 1190 1195 1200

[Formula 8]

```

GTT AAT GAG TGT GTG AAA TCA CAA TCG AAT AGG TAT GGC TTC TGT GGA AAT GGA ACA CAC 3560
V  N  E  C  V  K  S  Q  S  N  R  Y  G  P  C  G  N  G  T  H
      1205              1210              1215              1220
CTA TTC TCA CTT GTC AAT TCA GCA CCT GAA GGT TTG CTT TTC TTT CAC ACA GTT TTA CTT 3720
L  F  S  L  V  N  S  A  P  E  G  L  L  F  F  H  T  V  L  L
      1225              1230              1235              1240
CCT ACA GAA TGG GAA GAA GTG ACG GCA TGG TCA GGA ATA TGT GTT AAT GAT ACT TAT GCA 3780
P  T  E  W  E  E  V  T  A  W  S  G  I  C  V  N  D  T  Y  A
      1245              1250              1255              1260
TAT GTG TTG AAA GAT TTT GAT CAT TCC ATT TTC AGC TAC AAT GGC ACG TAT ATG GTA ACT 3840
Y  V  L  K  D  P  D  H  S  I  F  S  Y  N  G  T  Y  M  V  T
      1265              1270              1275              1280
CCT CGT AAC ATG TTT CAA CCT AGA AAG CCT CAG ATG AGT GAT TTC GTG CAA ATT ACG AGT 3900
P  R  N  M  F  Q  P  R  K  P  Q  M  S  D  F  V  Q  I  T  S
      1285              1290              1295              1300
TGT GAA GTG ACT TTT TTG AAC ATG ACA TAT ACG ACA TTT CAG GAG ATT GTG ATC GAT TAT 3960
C  E  V  T  F  L  N  M  T  Y  T  T  F  Q  E  I  V  I  D  Y
      1305              1310              1315              1320
ATT GAT ATT AAC AAG ACT ATC GCT GAT ATG CTT GAA CAA TAC AAT CCT AAT TAC ACA ACT 4020
I  D  I  N  K  T  I  A  D  M  L  E  Q  Y  N  P  N  Y  T  T
      1325              1330              1335              1340
CCT GAG CTA AAT CTA CTG CTG GAT ATC TTT AAT CAG ACA AAG TTA AAC CTC ACT GCA GAA 4080
P  E  L  N  L  L  L  D  I  F  N  Q  T  K  L  N  L  T  A  E
      1345              1350              1355              1360
ATA GAC CAA TTG GAA CAA AGA GCT GAC AAC CTC ACT ACT ATA GCA CAT GAG CTA CAG CAG 4140
I  D  Q  L  E  Q  R  A  D  N  L  T  T  I  A  H  E  L  Q  Q
      1365              1370              1375              1380
TAC ATT GAC AAT CTT AAT AAG ACG CTT GTT GAC CTT GAC TGG CTC AAC AGG ATT GAA ACT 4200
Y  I  D  N  L  N  K  T  L  V  D  L  D  W  L  N  R  I  E  T
      1385              1390              1395              1400
TAT GTA AAA TGG CCT TGG TAT GTG TGG TTA CTA ATA GGT TTA GTA GTA GTC TTC TGC ATA 4260
Y  V  K  W  P  W  Y  V  W  L  L  I  G  L  V  V  V  F  C  I
      1405              1410              1415              1420
CCA CTG TTA CTG TTT TGC TGT CTG AGT ACT GGT TTC TGT GGC TGT TTT GGT TGT GTT GGC 4320
P  L  L  L  F  C  C  L  S  T  G  F  C  G  C  F  G  C  V  G
      1425              1430              1435              1440
AGT TGT TGT CAT TCT CTT TGT AGT AGA AGG CAA TTT GAA ACC TAT GAA CCC ATT GAA AAG 4380
S  C  C  H  S  L  C  S  R  R  Q  F  E  T  Y  E  P  I  E  K
      1445              1450              1455              1460
GTT CAC ATT CAT
V  H  I  H

```

The protein which is the spike protein of cat infectivity peritonitis I-beam UISURU boiled and shown, and has the overall length of the protein of the amino acid sequence, or a part of the length, the polypeptide by which the sugar chain was added to them.

[Claim 3] The vector DNA structure of the plasmid for a manifestation which is DNA corresponding to the spike protein gene RNA of a cat infectivity peritonitis I-beam virus, and was built so that it might make proteinic [which was indicated by claim 2 / all or some of] discover.

[Claim 4] Protein produced by culture of the cell of the bacillus which is all or some of spike protein of a cat infectivity peritonitis I-beam virus, and contains the vector DNA for a manifestation according to claim 3, or an animal.

[Claim 5] The vaccine produced using the protein produced by claim 4, or the product for a diagnosis.

[Claim 6] The transformant in which the transformation was carried out by the plasmid built so that the protein in which an amino acid sequence has the overall length of the protein shown by drawing 1 - drawing 4 or a part of the length might be discovered.

[Claim 7] The transformant according to claim 6 whose transformant is a microorganism or an animal cell.

[Claim 8] The transformant according to claim 6 whose microorganism is E.coli.

[Claim 9] The transformant according to claim 6 whose microorganism is yeast.

[Translation done.]

*** NOTICES ***

JPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.*** shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Industrial Application] This invention relates to DNA corresponding to the spike protein gene RNA which is the surface antigen which exists in the outer vale of an I-beam virus among the viruses used as the cause of starting cat infectivity peritonitis, and its base sequence. It is related with the spike protein in which a code is carried out by the DNA sequence further again.

[0002] In this specification, the cable address of amino acid is as follows.

A: alanine C:cysteine D:aspartic-acid E: -- glutamic-acid F:phenylalanine G:glycine H:histidine I: -- isoleucine K:lysine L:leucine M:methionine N: -- asparagine P:proline Q:glutamine R:arginine S: -- serine T:threonine V:valine W:tryptophan Y: -- a thyrosin [0003]

[Description of the Prior Art] The infective peritonitis (Feline Infectious pertitonitis and Following FIP are called) of a cat is a viral infectious disease of chronic progressive looked at by many Felidae animals. This illness is caused by infection of the FIP virus (FIPV) which is coronavirus, the symptom mainly concerned with peritonitis is shown and, as for the animal whose symptoms were shown, at least a progressive antinode shows the flatulence by antinode water retention. Since it is not yet established, the cure to such an illness cannot but follow death-dealing progress, if symptoms develop.

[0004] Moreover, infection of the antibody dependency in which infection and its onset of FIPV are rash compared with the cat which does not hold the cat which holds the antibody to FIPV, and the enhancing effect of the onset are known [Pedersen et al., Am.J.Vet.Res., 41 volumes, and 868 (1980)].

Therefore, even if the vaccine which is not having this point taken into consideration is produced, if it remains as it is, it cannot be used for prevention, but has the difficult field of producing the risk of the opposite

effect which promotes infection and the onset on the contrary.

[0005] As for this FIPV, the diameter has three main structural protein, a spike (S), a membrane (M), and nucleocapsid (N), by about 100–150nm. The genome of a virus is the single stranded RNA of the plus strand of about 20,000 bases. FIPV is classified into the I-beam (growth is bad) and II mold (growth is good) from the difference in the growth in a cultured cell, respectively [Pedersen et al., Adv.Exp.Med.Biol., 173 volumes, and 365 (1984)].

[0006] Although the above-mentioned membrane (M) and nucleocapsid (N) protein crossed immunologically between the I-beam and II mold, most crossover nature about the spike (S) protein which plays a role important for formation of infection was not seen. moreover, [precious articles whose remainder 70 percent of the cat which showed the symptoms of FIP was an I-beam, and were II molds — ** — Arch.Virol., 117 volumes, 85 (1991), and].

[0007] Old research of FIPV has the high fecundity in a cell, and it has been advanced with II mold which is easy to receive a virus ingredient. The base sequence of the spike protein gene of II mold is already determined [de Groot et al., J.gen.Virol., 68 volumes, and 2639 (1987)]. On the other hand, about FIPV of an I-beam, gene-related research is not made at all an old place. Since most crossover nature of the spike protein of an I-beam and II mold was not seen in immunological research, it is presumed that the base sequences of those genes differ very much. Therefore, the amino acid sequence of the spike protein of I-beam FIPV presumed from the base sequence is considered to be a completely new thing.

[0008]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] Thus, the research on the gene of the spike protein which plays a central role in infection of I-beam FIPV which occupies 70 percent of the cat which showed the symptoms of cat infectivity peritonitis was not made at all until now. Therefore, infection prevention of I-beam FIPV and a therapy were expected the useful vaccine. So, this invention persons succeeded in finding out the amino acid sequence of the spike protein of I-beam FIPV, as a result of doing research on the gene of the spike protein which plays a central role to infection of I-beam FIPV.

[0009] The purpose of this invention is to offer DNA corresponding to the gene RNA of the spike protein which is the surface antigen which exists in the outer vale of an I-beam virus among the viruses used as the cause of starting cat infectivity peritonitis, and its base sequence, offers the spike protein in which a code is carried out by the base sequence further again, and provides infection prevention of I-beam FIPV, and a therapy with a useful vaccine. In addition, the result that the amino acid sequences of spike protein differ very much with an I-beam and II mold is obtained as later shown by the example in this invention. This is also the result of being

guessed from immunological crossover nature.

[0010]

[Means for Solving the Problem]

(1) [precious articles with which I-beam FIPV used two shares of KU(s) separated by this invention persons in culture of I-beam FIPV, and viral RNA extract this invention -- ** -- Vet.Microbiol., 28 volumes, 13 (1991), and].

The decision of the mold of a virus was made according to Pedersen's and others approach [Adv.Exp.Med.Biol. and 173 volumes (1984)].

[0011] KU2 virus of about 1,000 PFU was infected with the monolayer culture of a cat embryo established cell line, for 37 degrees C and seven days, the infected cells which produced cytopathy were collected after culture, the cell was crushed with the homogenizer, and the nucleus was removed in 3,000rpm and 15 minutes. Multistory [of the supernatant liquid] was carried out to cane sugar 30%, and virus precipitation was obtained in 200,000xg 2 hours. Precipitation was melted to 0.1M brine and derived protein was removed [SDS] for the phenol in equivalence in addition 15,000rpm, and 5 minutes 0.5%. Ethanol was added to the water layer and it cooled, and RNA was settled in 15,000rpm and 5 minutes, and was collected.

[0012] (2) Since it is hard to collect cDNA cloning of M gene fragment of I-beam FIPV, and FIPV(s) of a base-sequence-determination I-beam in the condition of having been isolated from the infected cell, they must crush an infected cell and must collect viruses. Therefore, the rate which contains the impurity of the cell origin in a start ingredient is higher than II mold virus. In consideration of this point, a specific primer is used in the case of cDNA composition, without using a nonspecific random primer. Therefore, it first performed determining the base sequence of M gene of I-beam FIPV which exists in the lower stream of a river of a spike gene.

[0013] A membrane and a nucleocapsid gene exist in the lower stream of a river of a spike gene as shown in the FIPV genetic map of drawing 5 . It is as having described above that the membrane in which these carry out a code, and nucleocapsid protein cross well immunologically with an I-beam and II mold. Therefore, in this field, the homology of the base sequence of II mold and an I-beam is considered to be a high thing. In addition, the base sequence of M gene of the II mold FIPV is that of [Vennema et al., Virology, 181 volumes, and 327] (1991) which have already been reported as a paper, refers to this and compounds two kinds of DNA primers, the following + chain and - chain.

[0014] TGGGGATCCGATTTTACGTAGTAAGCCCA(-)
CAAGAATTCGTGAACGCTACTGTGCCATG(+)

Using these primers, cDNA of (Membrane M) gene fragment of I-beam FIPV was amplified to drawing 6 by the roughly shown so-called RT(reverse transcriptase)-PCR method, cloning of it was carried out to it (clone 1 in

drawing 8), and the base sequence was determined as it.

[0015] (3) It referred to the base sequence of M gene fragment of I-beam FIPV obtained by (2) in which the spike protein gene carried out the cDNA cloning above, and CGAAGAATTCATATCTGGAAACTTGGTACTC (-) which is primer DNA with it and a complementarity (minus strand) was compounded. cDNA cloning of the spike protein gene RNA and the decision of a base sequence were made by the approach which showed the outline to drawing 7 using this.

[0016] In this case, although the basic method was the same as that of the above-mentioned (2), since the base sequence by the side of a five prime end was strange, the polydA taele is added to cDNA, cDNA of the gene fragment of I-beam FIPV was amplified by the so-called RT(reverse transcriptase)-PCR method which roughly showed an oligo dT primer and CTGTGAATTCTGCAGGATCCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT to drawing 6 as a plus strand primer, cloning of it was carried out (clone 2 in drawing 8), and that base sequence was determined. By determining a down-stream three-dash terminal side base sequence, it is checked that the corresponding cDNA clone is the gene fragment of FIPV. Moreover, the base sequence by the side of an upper five prime end turns into a base sequence by the side of strange spike protein.

[0017] It could refer to the base sequence by the side of the obtained five prime end, minus strand primer DNA was able to be compounded further, the cDNA clone which covers all the fields of the spike protein gene of I-beam FIPV as shown in drawing 8 by repeating this approach 4 times henceforth could be acquired, and all the base sequences of an I-beam FIPV spike protein gene were able to be determined by determining those base sequences.

[0018] (4) It refers to the base sequence of the I-beam spike protein gene of (3) in which recombination mold I-beam spike protein carried out the manifestation above, and 1 set of primers of a plus strand and a minus strand are compounded in the field of arbitration, and if PCR is performed, the gene fragment of the field can be amplified. If required for these, an initiation codon (ATG), termination codons (TGA etc.), or a restriction enzyme part can be included. In this way, as for the amplified gene fragment, it is possible to make it combine with vectors for a manifestation, such as well-known Escherichia coli, yeast, a baculovirus, and a vaccinia virus, and to make it discovered.

[0019]

[Example] Although the example of this invention is explained concretely below, that it is not what is restricted by this does not rub this invention until it says.

Decision of the base sequence of an example 1 I-beam FIPV spike protein

gene: In this invention, 2 shares of KU(s) virus which is I-beam FIPV was used, and cDNA cloning of the spike protein gene of an I-beam and the decision of a base sequence were made by the approach which showed the outline by the above (2) and (3).

[0020] The specific primer was used in this example, without using a nonspecific random primer in the case of cDNA composition. The base sequence of M gene of I-beam FIPV which exists in the lower stream of a river of a spike gene for that purpose was determined first. A membrane (M) and a nucleocapsid (N) gene exist in the lower stream of a river of a spike gene as shown in the FIPV genetic map of drawing 5.

[0021] Since it is as having mentioned above that the membrane in which these carry out a code, and nucleocapsid protein cross well immunologically with an I-beam and II mold, in this field, the homology of the base sequence of an I-beam and II mold must be high. The base sequence of the membrane gene of FIPV of II mold was that of [Vennema et al., Virology, 181 volumes, and p327] (1991) which have already been reported, referred to this and compounded two kinds of DNA primers. Those base sequences are as follows.

[0022] TGGGGATCCGATTTTACGTAGTAAGCCCA(-)
CAAGAATTCGTGAACGCTACTGTGCCATG(+)

cDNA cloning and the base sequence of M gene fragment of I-beam FIPV were determined as drawing 6 by the roughly shown approach using these DNA primers. First, a primer and TGGGGATCCGATTTTACGTAGTAAGCCCA (minus strand) are added to I-beam FIPV-RNA, and cDNA of I-beam FIPV is compounded with reverse transcriptase.

[0023] And the part was taken, the primer of the reaction mixture for PCR (product made from BERINGA), the above-mentioned minus strand, and a plus strand was added, PCR was performed, and the DNA fragment of a membrane gene was amplified. In addition to the fungus liquid of Escherichia coli HB one 101 which was made to combine this with BamHI of a plasmid vector pUC18, and an EcoRI part by T-fourDNA ligase, and was processed from calcium, cloning of the cDNA was carried out. The automatic base-sequence-determination machine (Applied Biosystem make) determined the base sequence of this cDNA using the kit for sequence of ABI (Applied Biosystem). On the occasion of this decision, the fluorescence primer method indicated by the kit for base sequences marketed from Applied Biosystem was followed.

[0024] Here, fluorescent labeling of the M13 primer used by this approach on the basis of the dideoxy chain termination method [Pro.N.A.S., 74 volumes, and p5463 (1971)] by Sanger and others is carried out so that A, C, G, and T can be identified, respectively. At the process which determines a base

sequence, applying DNA by which the indicator was carried out to electrophoresis, it carried out using Applied Biosystem automatic base-sequence-determination machine 373A. Thus, the primer DNA which has it and a complementarity based on the base sequence of the membrane gene fragment of determined I-beam FIPV (minus strand), i.e.,

CGAAGAATTCATATCTGGAACTTGGTACTC, was newly compounded.

[0025] cDNA cloning of the spike protein gene RNA and the decision of a base sequence were made by the approach which showed the outline to drawing 7 using this primer. Like the case of a membrane gene, a primer (-), i.e., TGGGGATCCGATTTTACGTAGTAAGCCCA, is added to I-beam viral RNA, and cDNA is compounded with reverse transcriptase. It is 2M to this. cDNA(s) of the single strand compounded in NaOH by decomposing FIPV-RNA in 1/10 amount in addition 60 degrees C, and 1 hour are collected.

[0026] The polydA chain was added to the three-dash terminal of this cDNA by the end mutase (TdT), and PCR was performed using the primer (+), i.e., CGAAGAATTCATATCTGGAACTTGGTACTC (-) and an oligo dT primer, i.e., CTGTGAATTCTGCAGGATCCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT.

[0027] And DNA fractionation longer than 1kb was collected, having applied amplified DNA to low melting temperature agarose electrophoresis. The restriction enzyme EcoRI cut this, cloning was carried out to the EcoRI part of puC18 of a plasmid vector, and the base sequence was determined. In this case, it is checked by determining the base sequence by the side of the primer which is a three-dash terminal side, and

CGAAGAATTCATATCTGGAACTTGGTACTC (-) that the corresponding cDNA clone is the gene fragment of FIPV, and the base sequence by the side of the primer which is a five prime end side, i.e.,

CTGTGAATTCTGCAGGATCCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT, turns into a base sequence by the side of a strange spike protein gene.

[0028] They are the further following minus strand primer (-), i.e.,

GACTCTTCAATATCCAGCTGAA, and

GGGGAATTCAGAGGTAAATAATACTTTAAGTG (-) based on this.

It compounded. By completely repeating this approach 4 times similarly henceforth, the cDNA clone which covers all the fields of the spike protein gene of I-beam FIPV as shown in drawing 8 could be acquired, and all the base sequences of an I-beam FIPV spike protein gene were able to be determined by determining those base sequences.

[0029] The amino acid sequence by which a code is carried out by that cause to the base sequence of DNA corresponding to the spike protein gene of I-beam FIPV at drawing 1 - drawing 4 is shown. These are de as expected from immunological crossover nature. The thing [J.gen.Virol., 68 volumes, and p2639 (1987)] of the II mold FIPV already reported by Groot and others was

a very different thing. The gene which carries out the code of the spike protein is 4392 base length (1464 amino acid residue).

[0030] Although the homology in the whole was about 60% when compared by performing computer analysis of the amino acid sequence of the spike protein of an I-beam and II mold The direction of the amino terminal side which hits the head of the spike protein considered to have a role important for infection of a virus From the C terminal side considered to have the role which makes the part fix to the outer vale of a virus, low, homologies are 31% and 60%, respectively, and completely differed from 17% by 276 amino acid sequences also in it.

[0031] The manifestation of example 2 spike protein: Since the array of the 276 amino acid residue by the side of the amino terminal of the spike protein obtained in the example 1 became clear [completely differing with an I-beam and II mold], it is thought that the peptide of this field can become what that identifies both molds is the most useful as an antigen. Then, the manifestation of the peptide of this field was performed using expression vector pGEX-2T (drawing 9 R> 9) of Escherichia coli. Therefore, in order to make the gene fragment which makes the peptide of the amino acid sequence numbers 33-276 in drawing 1 discover amplify by PCR first, the following DNA primers were compounded.

CCCGGATCCGAAAGGTTTGAACCTAATTTC(+)

CCCGAATTCCTAAGCATAGCCAGCACAAT (-)

[0032] PCR was performed by having used cDNA of the clone 5 in drawing 8 as mold, having used these as the primer, and the gene fragment made into the purpose was made to amplify. It was made to combine with pGEX-2T (drawing 9) which cut DNA refined by low melting temperature agarose electrophoresis with restriction enzymes BamHI and EcoRI, and were cut with the same restriction enzyme by T-fourDNA ligase, and, in addition to 105 shares of Escherichia coli JM which carried out calcium processing, strain I-N244 which may discover this peptide was obtained. It prepared for the strain which furthermore contains only JM105 and pGEX-2T vector.

[0033] The purpose protein was made to discover so that these may be cultivated till a logarithmic growth phase and isopropyl thiogalactoside (IPTG) may be set to 1mM. These were applied to SDS-10% polyacrylamide electrophoresis, and Coomassie coloring matter was made to dye. The result, was shown in drawing 10 . In drawing 10 , it has checked that the purpose peptide of I-244 was discovered by 4 of a lane.

[0034]

[Effect of the Invention] The base sequence of the spike gene of strange I-beam FIPV was determined for the first time by this invention, and it became clear that it differs from the thing of already known II mold very much. This shows the inadequate thing only with the already known vaccine

of II mold virus, in order to defend infection of cat infectivity peritonitis. And when the cat whose symptoms were shown was investigated, since the rate of an I-beam had accounted for 70 percent, it is very important to prevent infection of an I-beam virus, and it was admitted that this could be solved by this invention.

[0035] Moreover, since the peptide of the I-beam which is carrying out the code of the field without a homology in the I-beam and II mold in an amino terminal of spike protein can be discovered and the peptide of II mold which corresponds if same technique is performed also about II mold can be discovered, the effectiveness will be demonstrated if it applies to a diagnosis etc. as most useful antigen that identifies both.

[0036]

[Layout Table]

[0037] die-length [of an array]: -- mold [of 4392 arrays]: -- number [of DNA strands]: -- single strand topology: -- straight chain-like origin living thing name: -- a cat infectivity peritonitis virus array [** 9]

```

ATG ATA TTC ATA ATA CTT ACA CTC CTT AGC GTT GCC AAG TCT GAA GAC GCT CCT CAT GGT 60
M I F I I L T L L S V A K S E D A P H G
5 10 15 20
GTC ACC TTA CCC CAA TTT AAT ACG TCC CAT AAC AAT GAA AGG TTT GAA CTT AAT TTC TAC 120
V T L P Q F N T S H N N E R F E L N F Y
25 30 35 40
AAT TTC TTA CAA ACT TGG GAT ATA CCA CCA AAC ACA GAA ACC ATT CTA GGA GGT TAT CTG 180
N F L Q T W D I P P N T E T I L G G Y L
45 50 55 60
CCT TAT TGT GGA GCA GGG GTT AAT TGT GGG TGG TAT AAT TTT AGT CAA AGT GTG GGA CAA 240
P Y C G A G V N C G W Y N F S Q S V G Q
65 70 75 80
AAT GGT AAG TAT GCC TAC ATA AAC ACG CAA AAT CTG AAT ATA CCG AAC GTT CAT GGC GTC 300
N G K Y A Y I N T Q N L N I P N V H G V
85 90 95 100
TAT TTT GAC GTA AGA GAA CAT AAT AAT GAC GGT GAG TGG GAT GAT CGT GAT AAA GTT GGC 360
Y F D V R E H N N D G E W D D R D K V G
105 110 115 120
CTA TTG ATT GCT ATA CAT GGC AAC TCG AAG TAT AGT TTG CTT ATG GTT TTG CAG GAT GCT 420
L L I A I H G N S K Y S L L M V L Q D A
125 130 135 140
GTG GAA GCT AAT CAG CCC CAT GTT GCT GTT AAA ATT TGC CAT TGG AAG CCA GGT AAC ATA 480
V E A N Q P H V A V K I C H W K P G N I
145 150 155 160
AGT TCT TAT CAC GCG TTT AGT GTA AAT CTA GGA GAT GGT GGT CAA TGC GTG TTT AAT CAG 540
S S Y H A F S V N L G D G G Q C V F N Q
165 170 175 180
AGA TTT TCA TTG GAC ACC GTA TTG ACA ACT AAT GAC TTC TAT GGC TTC CAG TGG ACT GAC 600
R F S L D T V L T T N D F Y G F Q W T D
185 190 195 200
ACC TAT GTT GAT ATC TAT CTA GGT GGC ACT ATT ACT AAA GTG TGG GTT GAC AAT GAT TGG 660
T Y V D I Y L G G T I T K V W V D N D W
205 210 215 220
AGC ATT GTT GAA GCT AGC ATC TCC TAT CAT TGG AAT CGG ATT AAC TAT GGA TAT TAC ATG 720
S I V E A S I S Y E W N R I N Y G Y Y M
225 230 235 240
CAA TTT GTT AAT CGC ACC ACT TAT TAT GCG TAT AAT AAT ACT GGT GGT GCA AAT TAC ACA 780
Q F V N R T T Y Y A Y N N T G G A N Y T
245 250 255 260
CAA TTG CAG TTA AGC GAA TGC CAT ACT GAT TAT TGT GCT GGC TAT GCT AAG AAT GTC TTT 840
Q L Q L S E C H T D Y C A G Y A K N V P
265 270 275 280
GTG CCT ATA GAT GGT AAA ATA CCA GAA GAC TTC TCC TTT AGT AAC TGG TTT TTA TTG TCA 900
V P I D G K I P E D F S F S N W F L L S
285 290 295 300
GAT AAA TCC ACT TTG GTA CAA GGT CGT GTT CTT AGT AGT CAA CCA GTT TTT GTA CAA TGC 960
D K S T L V Q G R V L S S Q P V F V Q C
305 310 315 320
CTT AGG CCT GTA CCA TCG TGG TCT AAC AAT ACG GCT GTG GTG CAT TTT AAA AAT GAT GCC 1020
L R P V P S W S N E T A V V H F K N D A
325 330 335 340
TTC TCC CCT AAC GTC ACG GCA GAT GTT TTG AGG TTC AAT CTA AAT TTT AGT GAC ACT GAT 1080
F C P N V T A D V L R F N L N F S D T D
345 350 355 360
GTC TAT ACA GAT TCA ACT AAT GAT GAA CAG TTG TTT TTT ACA TTT GAA GAT AAT ACA ACT 1140
V Y T D S T N D E Q L F F T F E D N T T
365 370 375 380
GCC TCC ATA GCC TGT TAT AGC AGT GCC AAT GTC ACT GAT TTT CAG CCT GCA AAT AAT ACT 1200
A S I A C Y S S A N V T D F Q P A N N S
385 390 395 400

```

[Formula 10]

```

GTC TCT CAC ATT CCA TTT GGC AAA ACT GCG CAT TTC TGT TTT GGC AAT TTT TCT CAT TCA 1206
V S H I P F G K T A H F C F A N F S H S
405 410 415 420
ATT GTG AGC AGA CAG TTT TTG GGC ATA CTT CCA CCA ACT GTT CGA GAG TTT GCA TTT GGC 1320
I V S R Q F L G I L P P T V R E F A F G
425 430 435 440
AGA GAT GGA TCC ATT TTT GTC AAT GGC TAT AAA TAT TTT AGT TTA CCA GCT ATC AGG AGT 1380
R D G S I F V N G Y K Y F S L P A I R S
445 450 455 460
GTT AAC TTC TCC ATC AGT TCA GTA GAG GAG TAT GGC TTT TGG ACC ATA GCC TAT ACT AAC 1440
V N F S I S S V E E Y G F W T I A Y T N
465 470 475 480
TAT ACA GAT GTA ATG GTG GAT GTT AAT GGC ACA GCT ATT ACT AGG CTA TTC TAT TGT GAC 1500
Y T D V M V D V N G T A I T R L F Y C D
485 490 495 500
TCG CCC CTC AAT AGA ATT AAG TGT CAA CAA TTA AAG CAT GAA TTG CCA GAC GGG TTT TAT 1560
S P L N R I K C Q Q L K H E L P D G F Y
505 510 515 520
TCT GCT AGT ATG CTT GTT AAA AAG GAT TTA CCC AAA ACA TTT GTT ACC ATG CCA CAG TTT 1620
S A S M L V K K D L P K T F V T M P Q F
525 530 535 540
TAC CAC TGG ATG AAT GTC ACG TTA CAT GTT GTA TTA AAT GAC ACA GAG AAA AAG TAT GAC 1680
Y H W M N V T L H V V L N D T E K K Y D
545 550 555 560
ATC ATT CTC GCT AAA GCC CCT GAG CTA GCA GCA CTC GCG GAT GTA CAT TTT GAA ATA GCT 1740
I I L A K A P E L A A L A D V H F E I A
565 570 575 580
CAG GCT AAC GGC AGT GTA ACT AAT GTT ACT AGC CTA TGT GTC CAA GCA AGA CAG TTG GCT 1800
Q A N G S V T N V T S L C V Q A R Q L A
585 590 595 600
CTA TTT TAT AAG TAT ACT AGC TTA CAA GGT TTG TAT ACT TAT TCT AAC TTA GTG GAG CTA 1860
L F Y K Y T S L Q G L Y T Y S N L V E L
605 610 615 620
CAA AAT TAT GAC TGC CCC TTC TCA CCG CAG CAG TTT AAT AAT TAT TTG CAG TTT GAA ACT 1920
Q N I D C P F S P Q Q F N N Y L Q F E T
625 620 635 640
TTA TGT TTT GAT GTG AAC CCT GCT GTG GCA GGT TGT AAG TGG TCG TTA GTT CAT GAT GTC 1980
L C F D V N P A V A G C K W S L V H D V
645 650 655 660
CAG TGG CGT ACG CAG TTC GCC ACC ATT ACG GTT TCT TAT AAA CAT GGT TCT ATG ATC ACT 2040
Q W R T Q F A T I T V S Y K H G S M I T
665 670 675 680
ACC CAT GCC AAG GGG CAC AGT TGG GGT TTT CAA GAT ACC TCT GTT TTG GTA AAA GAT GAA 2100
T H A K G H S N G F Q D T S V L V K D E
685 690 695 700
TGT ACT GAC TAC AAT ATA TAT GGC TTT CAG GGC ACA GGC ATT ATT AGA AAC ACC ACC TCA 2160
C T D Y N I Y G F Q G T G I I R N T T S
705 710 715 720
AGG TTA GTG GCT GGT CTT TAC TAC ACA TCT ATT AGT GGT GAC CTT CTA GCC TTT AAA AAT 2220
R L V A G L Y Y T S I S G D L L A F K N
725 730 735 740
AGT ACT ACT GGT GAG ATT TTC ACT GTA GTG CCA TGT GAT CTA ACA GCA CAA GTA GCT GTG 2280
S T T G E I F T V V P C D L T A Q V A V
745 750 755 760
ATT AAT GAT GAG ATA GTG GGA GCT ATA ACA GCC GTT AAT CAA ACT GAT CTG TTT GAG TTC 2340
I N D E I V G A I T A V N Q T D L F E F
765 770 775 780
GTA AAT AAC ACA CAG GCG AGA AGA TCA CGT AGT TCA ACA CCA AAT TTT GTA ACA TCC TAT 2400
V N N T Q A R R S R S S T P N F V T S Y
785 790 795 800

```

[Formula 11]

```

ACT ATG CCA CAA TTT TAT TAC ATA ACA AAA TGG AAT AAT GAC ACA TCG TCC AAT TGT ACA 2450
T M P Q F Y Y I T K N N N D T S S N C T
805 810 815 820
TCT GCC AAT ACC TAC TCC TCT TTT GCT ATT TGT AAT ACT GGT GAG ATT AAA TAT GTT AAT 2520
S A I T Y S S F A I C N T G E I K Y V N
825 830 835 840
GTC ACT CAT GTT GAA ATT GTG GAT GAT AGT ATA GGC GTT ATT AAA CCT GTT TCA ACA GGT 2580
V T H V E I V D D S I G V I K P V S T G
845 850 855 860
AAC ATA TCG ATA CCT AAA AAC TTC ACT GTC GCA GTA CAA GCT GAA TAC ATT CAG ATT CAA 2640
N I S I P K N F T V A V Q A E Y I Q I Q
865 870 875 880
GTC AAA CCT GTT GTT GTG GAT TGT GCC ACG TAT GTT TGT AAT GGC AAT ACA CAT TGC CTC 2700
V K P V V V D C A F Y V C N G N T H C L
885 890 895 900
AAA TTA CTA ACA CAA TAC ACC TCA GCT TGT CAG ACA ATT GAA AAT GCC CTT AAT CTT GGT 2760
K L L T Q Y T S A C Q T I E N A L N L G
905 910 915 920
GCA CGT CTT GAA TCG TTA ATG CTT AAT GAT ATG ATT ACA GTA TCA GAT CGT GGT TTG GAG 2820
A R L E S L M L N D M I T V S D R G L E
925 930 935 940
CTT GCA ACT GTT GAA AGA TTC AAT GCC ACA GCT TTA GGT GGT GAA AAG CTA GGC GGT TTA 2880
L A T V E R F N A T A L G G E K L G G L
945 950 955 960
TAT TTT GAT GGC CTG AGC AGT CTA TTA CCG CCT AAA ATT GGT AAG AGG TCG GCT GTT GAA 2940
Y F D G L S S L L P P K I G K R S A V E
965 970 975 980
GAT CTA TTG TTC AAT AAA GTG GTG ACC AGC GGT CTT GGC ACT GTT GAT GAT GAC TAT AAA 3000
D L L F N K V V T S G L G T V D D D Y K
985 990 995 1000
AAG TGC TCT TCC GGC ACT GAC GTT GCA GAT CTA GTT TGT GCC CAA TAT TAC AAT GGC ATA 3060
K C S S G T D V A D L V C A Q Y Y N G I
1005 1010 1015 1020
ATG GTT TTA CCT GGT GTT GTG GAT GGT AAT AAG ATG TCT ATG TAC ACT GCA TCT TTA ATT 3120
M V L P G V V D G N K M S M Y T A S L I
1025 1030 1035 1040
GGC GGT ATG GCT TTG GGC TCT ATT ACA TCC GCT GTA GCT GTT CCT TTC GCC ATG CAA GTG 3180
G G M A L G S I T S A V A V P F A M Q V
1045 1050 1055 1060
CAG GCG AGG CTT AAT TAT GTC GCA CTA CAA ACT GAT GTT TTG CAG GAG AAC CAA AAA ATA 3240
Q A R L N Y V A L Q T D V L Q E N Q K I
1065 1070 1075 1080
CTT GCT AAT GCC TTT AAT AAT GCC ATT GGT AAC ATT ACA CTA GCG CTT GGA AAA GTT TCT 3300
L A N A F N N A I G N I T L A L G K V S
1085 1090 1095 1100
AAT GCT ATT ACA ACC ACA TCA GAT GGT TTT AAT AGT ATG GCC TCA GCA CTG ACT AAG ATC 3360
N A I T T T S D G F N S M A S A L T K I
1105 1110 1115 1120
CAG AGT GTA GTC AAT CAA CAG GGT GAA GCG TTA AGT CAA CTT ACT AGT CAG TTA CAG AAG 3420
Q S V V N Q Q G E A L S Q L T S Q L Q K
1125 1130 1135 1140
AAC TTT CAG GCT ATC AGC AGT TCC ATT GCT GAA ATT TAT AAT AGG CTG GAG AAG GTG GAA 3480
N F Q A I S S S I A E I Y N R L E K V E
1145 1150 1155 1160
GCT GAT GCC CAA GTT GAC CGT CTC ATT ACT GGT AGA TTG GCA GCA CTT AAT GCT TAT GTG 3540
A D A Q V D R L I T G R L A A L N A Y V
1165 1170 1175 1180
TCT CAA ACT CTA ACT CAG TAT GCT GAA GTC AAG GCC AGT AGG CAA ATT GCA TTG GAG AAA 3600
S Q T L T Q Y A E V K A S R Q I A L E K
1185 1190 1195 1200

```

[Formula 12]

```

GTT AAT GAG TGT GTG AAA TCA CAA TCG AAT AGG TAT GGC TTC TGT GGA AAT GGA ACA CAC 3650
V  N  E  C  V  K  S  Q  S  N  R  Y  G  F  C  G  N  G  T  H
      1205              1210              1215              1220
CTA TTC TCA CTT GTC AAT TCA GCA CCT GAA GGT TTG CTT TTC TTT CAC ACA GTT TTA CTT 3720
L  F  S  L  V  M  S  A  P  E  G  L  L  F  F  H  T  V  L  L
      1225              1230              1235              1240
CCT ACA GAA TGG GAA GAA GTG ACG GCA TGG TCA GGA ATA TGT GTT AAT GAT ACT TAT GCA 3780
P  T  E  W  E  E  V  T  A  W  S  G  I  C  V  N  D  T  Y  A
      1245              1250              1255              1260
TAT GTG TTG AAA GAT TTT GAT CAT TCC ATT TTC AGC TAC AAT GGC ACG TAT ATG GTA ACT 3840
Y  V  L  K  D  F  D  H  S  I  F  S  Y  N  G  T  Y  M  V  T
      1265              1270              1275              1280
CCT CGT AAC ATG TTT CAA CCT AGA AAG CCT CAG ATG AGT GAT TTC GTG CAA ATT ACG AGT 3900
P  R  N  M  F  Q  P  R  K  P  Q  M  S  D  F  V  Q  I  T  S
      1285              1290              1295              1300
TGT GAA GTG ACT TTT TTG AAC ATG ACA TAT ACG ACA TTT CAG GAG ATT GTG ATC GAT TAT 3960
C  E  V  T  F  L  N  M  T  Y  T  T  F  Q  E  I  V  I  D  Y
      1305              1310              1315              1320
ATT GAT ATT AAC AAG ACT ATC GCT GAT ATG CTT GAA CAA TAC AAT CCT AAT TAC ACA ACT 4020
I  D  I  N  K  T  I  A  D  M  L  E  Q  Y  N  P  N  Y  T  T
      1325              1330              1335              1340
CCT GAG CTA AAT CTA CTG CTG GAT ATC TTT AAT CAG ACA AAG TTA AAC CTC ACT GCA GAA 4080
P  E  L  N  L  L  L  D  I  F  N  Q  T  K  L  N  L  T  A  E
      1345              1350              1355              1360
ATA GAC CAA TTG GAA CAA AGA GCT GAC AAC CTC ACT ACT ATA GCA CAT GAG CTA CAG CAG 4140
I  D  Q  L  E  Q  R  A  D  N  L  T  T  I  A  H  E  L  Q  Q
      1365              1370              1375              1380
TAC ATT GAC AAT CTT AAT AAG ACG CTT GTT GAC CTT GAC TGG CTC AAC AGG ATT GAA ACT 4200
Y  I  D  N  L  N  K  T  L  V  D  L  D  W  L  N  R  I  E  T
      1385              1390              1395              1400
TAT GTA AAA TGG CCT TGG TAT GTG TGG TTA CTA ATA GGT TTA GTA GTA GTC TTC TGC ATA 4260
Y  V  K  W  P  W  Y  V  W  L  L  I  G  L  V  V  V  F  C  I
      1405              1410              1415              1420
CCA CTG TTA CTG TTT TGC TGT CTG AGT ACT GGT TTC TGT GGC TGT TTT GGT TGT GTT GGC 4320
P  L  L  L  F  C  C  L  S  T  G  F  C  G  C  F  G  C  V  G
      1425              1430              1435              1440
AGT TGT TGT CAT TCT CTT TGT AGT AGA AGG CAA TTT GAA ACC TAT GAA CCC ATT GAA AAG 4380
S  C  C  H  S  L  C  S  R  R  Q  F  E  T  Y  E  P  I  E  K
      1445              1450              1455              1460
GTT CAC ATT CAT
V  H  I  H

```

[Translation done.]

*** NOTICES ***

JP0 and NCIP1 are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.*** shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

DESCRIPTION OF DRAWINGS

[Brief Description of the Drawings]

[Drawing 1] The base sequence of an I-beam FIPV spike protein gene and the amino acid sequence by which a code is carried out by that cause are shown.

[Drawing 2] The base sequence of the I-beam FIPV spike protein gene following drawing 1 and the amino acid sequence by which a code is carried out by that cause are shown.

[Drawing 3] The base sequence of the I-beam FIPV spike protein gene following drawing 2 and the amino acid sequence by which a code is carried out by that cause are shown.

[Drawing 4] The base sequence of the I-beam FIPV spike protein gene following drawing 3 and the amino acid sequence by which a code is carried out by that cause are shown.

[Drawing 5] It is a genetic map about the virus configuration protein gene of FIPV.

[Drawing 6] It is the outline of the process of cDNA cloning according a membrane gene fragment to RT(reverse transcriptase)-PCR method.

[Drawing 7] It is the outline of the process of cDNA cloning by the approach to which adds a polydA chain for a spike protein gene using TdT (end mutase), and PCR is applied.

[Drawing 8] cDNA acquired by this invention is arranged on a genetic map.

[Drawing 9] It is the genetic map of expression vector pGEX-2T in Escherichia coli.

[Drawing 10] It is the result of checking discovering some fields of the spike protein of an I-beam and II mold using pGEX-2T in an example 2 by SDS-polyacrylamide electrophoresis.

[Translation done.]

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平7-327683

(43)公開日 平成7年(1995)12月19日

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09	Z N A			
A 6 1 K 39/215	A F E			
C 0 7 K 14/165		8318-4H		
C 1 2 P 21/02		Z 9282-4B		
		9281-4B		
			C 1 2 N 15/ 00	Z N A A
審査請求 未請求 請求項の数9 O L (全 23 頁) 最終頁に続く				

(21)出願番号 特願平6-129300

(22)出願日 平成6年(1994)6月10日

(71)出願人 390027214

社団法人北里研究所

東京都港区白金5丁目9番1号

(72)発明者 小山 弘之

青森県十和田市東十一番町21-20

(72)発明者 宝達 勉

青森県十和田市相坂字白上248-213

(72)発明者 橋本 紘

東京都港区白金5丁目9番地1号 社団法人北里研究所内

(72)発明者 相沢 主税

東京都港区白金5丁目9番地1号 社団法人北里研究所内

(74)代理人 弁理士 小林 和憲

(54)【発明の名称】 ネコ伝染性腹膜炎I型ウイルスのスパイク蛋白質遺伝子RNAに対応するDNA

(57)【要約】

【目的】 ネコ伝染性腹膜炎I型ウイルスのスパイク蛋白質遺伝子RNAに対応するDNAの塩基配列の決定、およびそれにコードされるアミノ酸配列を有するポリペプチドを得るものである。

【構成】 ネコ伝染性腹膜炎I型ウイルスのスパイク蛋白質の遺伝子RNAに対応するDNA、およびそれにコードされるアミノ酸配列を有するポリペプチド、ならびにポリペプチドを発現し得るベクターDNA構造物、それにより形質転換された形質転換体である。

【効果】 ネコ伝染性腹膜炎ウイルス感染の予防または治療に使用し得るワクチン及び診断用の試薬が製造される。

【特許請求の範囲】

【化1】

【請求項1】 下記の配列

```

ATG ATA TTC ATA ATA CTT ACA CTC CTT AGC GTT GCC AAG TCT GAA GAC GCT CCT CAT GGT 50
M I F I I L T L L S V A K S E D A P H Q
5 10 15 20
GTC ACC TTA CCC CAA TTT AAT ACG TCC CAT AAC AAT GAA AGG TTT GAA CTT AAT TTC TAC 120
V T L P Q F N T S H N N E R F E L N F Y
25 30 35 40
AAT TTC TTA CAA ACT TGG GAT ATA CCA CCA AAC ACA GAA ACC ATT CTA GGA GGT TAT CTG 180
N F L Q T W D I P P N T E T I L G G Y L
45 50 55 60
CCT TAT TGT GGA GCA GGG GTT AAT TGT GGG TGG TAT AAT TTT AGT CAA AGT GTG GGA CAA 240
P Y C G A G V N C G W Y N F S Q S V G Q
65 70 75 80
AAT GGT AAG TAT GCC TAC ATA AAC ACG CAA AAT CTG AAT ATA CCG AAC GTT CAT GGC GTC 300
N G K I A Y I N T Q N L N I P N V K G V
85 90 95 100
TAT TTT GAC GTA AGA GAA CAT AAT AAT GAC GGT GAG TGG GAT GAT CGT GAT AAA GTT GGC 360
Y F D V R E H N N D G E W D D R D K V G
105 110 115 120
CTA TTG ATT GCT ATA CAT GGC AAC TCG AAG TAT AGT TTG CTT ATG GTT TTG CAG GAT GCT 420
L L I A I H G N S K Y S L L N V L Q D A
125 130 135 140
GTG GAA GCT AAT CAG CCC CAT GTT GCT GTT AAA ATT TGC CAT TGG AAG CCA GGT AAC ATA 480
V E A N Q P H V A V K I C H W K P G N I
145 150 155 160
AGT TCT TAT CAC GCG TTT AGT GTA AAT CTA GGA GAT GGT GGT CAA TGC GTG TTT AAT CAG 540
S S Y H A F S V N L G D G G Q C V F N Q
165 170 175 180
AGA TTT TCA TTG GAC ACC GTA TTG ACA ACT AAT GAC TTC TAT GGC TTC CAG TGG ACT GAC 600
R F S L D T V L T T N D F Y G F Q W T D
185 190 195 200
ACC TAT GTT GAT ATC TAT CTA GGT GGC ACT ATT ACT AAA GTG TGG GTT GAC AAT GAT TGG 660
T Y V D I Y L G G T I T H V W V D N D W
205 210 215 220
AGC ATT GTT GAA GCT AGC ATC TCC TAT CAT TGG AAT CCG ATT AAC TAT GGA TAT TAC ATG 720
S I V E A S I S Y H W N R I N Y G Y Y M
225 230 235 240
CAA TTT GTT AAT CGC ACC ACT TAT TAT GCG TAT AAT AAT ACT GGT GGT GCA AAT TAC ACA 780
Q F V N R T T Y Y A Y N N T G G A N Y T
245 250 255 260
CAA TTG CAG TTA AGC GAA TGC CAT ACT GAT TAT TGT GCT GGC TAT GCT AAG AAT GTC TTT 840
Q L Q L S E C H T D Y C A G Y A K N V F
265 270 275 280
GTG CCT ATA GAT GGT AAA ATA CCA GAA GAC TTC TCC TTT AGT AAC TGG TTT TTA TTG TCA 900
V P I D G K I P E D F S F S N W F L L S
285 290 295 300
GAT AAA TCC ACT TTG GTA CAA GGT GGT GTT CTT AGT AGT CAA CCA GTT TTT GTA CAA TGC 960
D K S T L V Q G R V L S S Q P V F V Q C
305 310 315 320
CTT AAG CCT GTA CCA TCG TGG TCT AAC AAT ACG GCT GTG GTG CAT TTT AAA AAT GAT GCC 1020
L R P V P S W S N N T A V V H F K N D A
325 330 335 340
TTC TGC CCT AAC GTC ACG GCA GAT GTT TTG AGG TTC AAT CTA AAT TTT AGT GAC ACT GAT 1080
F C P N V T A D V L R F N L N F S D T D
345 350 355 360
GTC TAT ACA GAT TCA ACT AAT GAT GAA CAG TTG TTT TTT ACA TTT GAA GAT AAT ACA ACT 1140
V Y T D S T N D E Q L F F T F E D N T T
365 370 375 380
GCC TCC ATA GCC TGT TAT ACG AGT GCC AAT GTC ACT GAT TTT CAG CCT GCA AAT AAT AGT 1200
A S I A C Y S S A N V T D F Q P A N N S
385 390 395 400

```

【化2】

3
 GTC TCT CAC ATT CCA TTT GGC AAA ACT GCG CAT TTC TGT TTT GCC AAT TTT TCT CAT TCA 1206
 V S H I P P G K T A H F C F A N F S H S
 405 410 415 420
 ATT GTG AGC AGA CAG TTT TTG GGC ATA CTT CCA CCA ACT GTT CGA GAG TTT GCA TTT GGC 1320
 I V S R Q F L G I L P P T V R E F A F G
 425 430 435 440
 AGA GAT GGA TCC ATT TTT GTC AAT GGC TAT AAA TAT TTT AGT TTA CCA GCT ATC AGG AGT 1380
 R D G S I F V N G Y K Y P S L P A I R S
 445 450 455 460
 GTT AAC TTC TCC ATC AGT TCA GTA GAG GAG TAT GGC TTT TGG ACC ATA GCC TAT ACT AAC 1440
 V N F S I S S V E E Y G F W T I A Y T N
 465 470 475 480
 TAT ACA GAT GTA ATG GTG GAT GTT AAT GGC ACA GCT ATT ACT AGG CTA TTC TAT TGT GAC 1500
 Y T D V M V D V N G T A I T R L F Y C D
 485 490 495 500
 TCG CCC CTC AAT AGA ATT AAG TGT CAA CAA TTA AAG CAT GAA TTG CCA GAC GGG TTT TAT 1560
 S P L N R I K C Q Q L N H E L P D G F Y
 505 510 515 520
 TCT GCT AGT ATG CTT GTT AAA AAG GAT TTA CCC AAA ACA TTT GTT ACC ATG CCA CAG TTT 1620
 S A S M L V K K D L P K T F V T M P Q F
 525 530 535 540
 TAC CAC TGG ATG AAT GTC ACG TTA CAT GTT GTA TTA AAT GAC ACA GAG AAA AAG TAT GAC 1680
 Y H W M N V T L H V V L N D T E K K Y D
 545 550 555 560
 ATC ATT CTC GGT AAA GCC CCT GAG CTA GCA GCA CTC GCG GAT GTA CAT TTT GAA ATA GCT 1740
 I I L A K A P E L A A L A D V H F E I A
 565 570 575 580
 CAG GCT AAC GGC AGT GTA ACT AAT GTT ACT AGC CTA TGT GTC CAA GCA AGA CAG TTG GCT 1800
 Q A N G S V T N V T S L C V Q A R Q L A
 585 590 595 600
 CTA TTT TAT AAG TAT ACT AGC TTA CAA GGT TTG TAT ACT TAT TCT AAC TTA GTG GAG CTA 1860
 L F Y K Y T S L Q G L Y T Y S N L V E L
 605 610 615 620
 CAA AAT TAT GAC TGC CCC TTC TCA CCG CAG CAG TTT AAT AAT TAT TTG CAG TTT GAA ACT 1920
 Q N Y D C P F S P Q Q F N N Y L Q F E T
 625 630 635 640
 TTA TGT TTT GAT GTG AAC CCT GCT GTG GCA GGT TGT AAG TGG TCG TTA GTT CAT GAT GTC 1980
 L C F D V N P A V A G C K W S L V H D V
 645 650 655 660
 CAG TGG COT ACG CAG TTC GCC ACC ATT ACG GTT TCT TAT AAA CAT GGT TCT ATG ATC ACT 2040
 Q W R T Q F A T I T V S Y K H G S M I T
 665 670 675 680
 ACC CAT GCC AAG GGG CAC AGT TGG GGT TTT CAA GAT ACC TCT GTT TTG GTA AAA GAT GAA 2100
 T H A K G H S W G F Q D T S V L V K D E
 685 690 695 700
 TGT ACT GAC TAC AAT ATA TAT GGC TTT CAG GGC ACA GGC ATT ATT AGA AAC ACC ACC TCA 2160
 C T D Y N I Y G F Q G T G I I R N T T S
 705 710 715 720
 AAG TTA GTG GCT GGT CTT TAC TAC ACA TCT ATT AGT GGT GAC CTT CTA GCC TTT AAA AAT 2220
 R L V A G L Y Y T S I S G D L L A F K N
 725 730 735 740
 AGT ACT ACT GGT GAG ATT TTC ACT GTA GTG CCA TGT GAT CTA ACA GCA CAA GTA GCT GTG 2280
 S T T G E I F T V V P C D L F A Q V A V
 745 750 755 760
 ATT AAT GAT CAC ATA GTG GCA GCT ATA ACA GCC GTT AAT CAA ACT GAT CTG TTT GAG TTC 2340
 I N D E I V G A I T A V N Q T D L F E F
 765 770 775 780
 GTA AAT AAC ACA CAG GCG AGA AGA TCA CGT AGT TCA ACA CCA AAT TTT GTA ACA TCC TAT 2400
 V N N T Q A R R S R S S T P N P V T S Y
 785 790 795 800

5
 ACT ATG CCA CAA TTT TAT TAC ATA ACA AAA TGG AAT AAT GAC ACA TCG TCC AAT TGT ACA 2460
 T M P Q P Y Y I T K W N N D T S S N C P
 805 810 815 820
 TCT GCC ATT ACC TAC TCC TCT TTT GCT ATT TGT AAT ACT GGT GAG ATT AAA TAT GTT AAT 2520
 S A I T Y S S P A I C N T G E I K Y V N
 825 830 835 840
 GTC ACT CAT GTT GAA ATT GTG GAT GAT AGT ATA GGC GTT ATT AAA CCT GTT TCA ACA GGT 2580
 V T H V E I V D D S I G V I K D V S T G
 845 850 855 860
 AAC ATA TCG ATA CCT AAA AAC TTC ACT GTC GCA GTA CAA GCT GAA TAC ATT CAG ATT CAA 2640
 N I S I P K N P T V A V Q A E Y I Q I Q
 865 870 875 880
 GTC AAA CCT GTT GTT GTG GAT TGT GCC ACG TAT GTT TGT AAT GGC AAT ACA CAT TGC CTC 2700
 V K P V V V D C A T Y V C N G N T H C L
 885 890 895 900
 AAA TTA CTA ACA CAA TAC ACC TCA GCT TGT CAG ACA ATT GAA AAT GCC CTT AAT CTT GGT 2760
 K L L T Q Y T S A C Q T I E N A L N L G
 905 910 915 920
 GCA CGT CTT GAA TCG TTA ATG CTT AAT GAT ATG ATT ACA GTA TCA GAT CGT GGT TTG GAG 2820
 A R L E S L M L N D M I T V S D R G L E
 925 930 935 940
 CTT GCA ACT GTT GAA AGA TTC AAT GCC ACA GCT TTA GGT GGT GAA AAG CTA GGC GGT TTA 2880
 L A T V E R F N A T A L G G E K L G G L
 945 950 955 960
 TAT TTT GAT GGC CTG AGC AGT CTA TTA CCG CCT AAA ATT GGT AAG AGG TCG GCT GTT GAA 2940
 Y F D G L S S L L P P K I G K R S A V E
 965 970 975 980
 GAT CTA TTG TTC AAT AAA GTG GTG ACC AGC GGT CTT GGC ACT GTT GAT GAT GAC TAT AAA 3000
 D L L P N K V V T S G L G T V D D D Y K
 985 990 995 1000
 AAG TGC TCT TCC GGC ACT GAC GTT GCA GAT CTA GTT TGT GCC CAA TAT TAC AAT GGC ATA 3060
 K C S S G T D V A D L V C A Q Y I N G I
 1005 1010 1015 1020
 ATG GTT TTA CCT GTT GTG GAT GGT AAT AAG ATG TCT ATG TAC ACT GCA TCT TTA ATT 3120
 M V L P G V V D G N K M S N Y T A S L I
 1025 1030 1035 1040
 GGC GGT ATG GCT TTG GGC TCT ATT ACA TCC GCT GTA GCT GTT CCT TTC GCC ATG CAA GTG 3180
 G G M A L G S I T S A V A V P F A N Q V
 1045 1050 1055 1060
 CAG GCG AGG CTT AAT TAT GTC GCA CTA CAA ACT GAT GTT TTG CAG GAG AAC CAA AAA ATA 3240
 Q A R L N Y V A L Q T D V L Q E N Q K I
 1065 1070 1075 1080
 CTT GCT AAT GCC TTT AAT AAT GCC ATT GGT AAC ATT ACA CTA GCG CTT GGA AAA GTT TCT 3300
 L A N A P N N A I G N I T L A L G K V S
 1085 1090 1095 1100
 AAT GCT ATT ACA ACC ACA TCA GAT GGT TTT AAT AGT ATG GCC TCA GCA CTG ACT AAG ATC 3360
 N A I F T T S D G F N S M A S A L T K I
 1105 1110 1115 1120
 CAG AGT GTA GTC AAT CAA CAG GGT GAA GCG TTA AGT CAA CTT ACT AGT CAG TTA CAG AAG 3420
 Q S V V N Q Q G E A L S Q L T S Q L Q H
 1125 1130 1135 1140
 AAC TTT CAG GCT ATC AGC AGT TCC ATT GCT GAA ATT TAT AAT AGG CTG GAG AAG GTG GAA 3480
 N F Q A I S S S I A E I Y N R L E K V E
 1145 1150 1155 1160
 GCT GAT GCC CAA GTT GAC CGT CTC ATT ACT GGT AGA TTG GCA GCA CTT AAT GCT TAT GTG 3540
 A D A Q V D R L I T G R L A A L N A Y V
 1165 1170 1175 1180
 TCT CAA ACT CTA ACT CAG TAT GCT GAA GTC AAG GCC ACT AGC CAA ATT GCA TTG GAG AAA 3600
 S Q T L T Q Y A E V K A S R Q I A L E K
 1185 1190 1195 1200

7
 GTT AAT GAG TGT GTG AAA TCA CAA TCG AAT AGG TAT GGC TTC TGT GGA AAT GGA ACA CAC 3660
 V M E C V K S Q S H R Y G F C G N G T H
 1205 1210 1215 1220
 CTA TTC TCA CTT GTC AAT TCA GCA CCT GAA GGT TTG CTT TTC TTT CAC ACA GTT TTA CTT 3720
 L F S L V N S A P E G L L F F H T V L L
 1225 1230 1235 1240
 CCT ACA GAA TGG GAA GAA GTG ACG GCA TGG TCA GGA ATA TGT GTT AAT GAT ACT TAT GCA 3780
 P T E W E E V T A N S G I C V H D T Y A
 1245 1250 1255 1260
 TAT GTG TTG AAA GAT TTT GAT CAT TCC APT TTC AGC TAC AAT GGC ACG TAT ATG GTA ACT 3840
 Y V L K D F D H S I F S Y N Q T Y M V T
 1265 1270 1275 1280
 CCT CGT AAC ATG TTT CAA CCT AGA AAG CCT CAG ATG AGT GAT TTC GTG CAA ATT ACG AGT 3900
 P R N M F Q P R K P Q M S D F V Q I T S
 1285 1290 1295 1300
 TGT GAA GTG ACT TTT TTG AAC ATG ACA TAT ACG ACA TTT CAG GAG ATT GTG ATC GAT TAT 3960
 C E V T F L N M T Y T Y F Q E I V I D Y
 1305 1310 1315 1320
 ATT GAT ATT AAC AAG ACT ATC GCT GAT ATG CTT GAA CAA TAC AAT CCT AAT TAC ACA ACT 4020
 I D I N K T I A D M L E Q Y N P N Y T T
 1325 1330 1335 1340
 CCT GAG CTA AAT CTA CTG CTG GAT ATC TTT AAT CAG ACA AAG TTA AAC CTC ACT GCA GAA 4080
 P E L N L L L D I F N Q T K L N L T A E
 1345 1350 1355 1360
 ATA GAC CAA TTG GAA CAA AGA GCT GAC AAC CTC ACT ACT ATA GCA CAT GAG CTA CAG CAG 4140
 I D Q L E Q R A D M L T T I A H E L Q Q
 1365 1370 1375 1380
 TAC ATT GAC AAT CTT AAT AAG ACG CTT GTT GAC CTT GAC TGG CTC AAC AGG ATT GAA ACT 4200
 Y I D N L N K T L V D L D W L N R I E T
 1385 1390 1395 1400
 TAT GTA AAA TGG CCT TGG TAT GTG TGG TTA CTA ATA GGT TTA GTA GTA GTC TTC TGC ATA 4260
 Y V K W P W Y V W L L I G L V V V F C I
 1405 1410 1415 1420
 CCA CTG TTA CTG TTT TGC TGT CTG AGT ACT GGT TTC TGT GGC TGT TTT GGT TGT GTT GGC 4320
 P L L L F C C L S T G F C G C F G C V G
 1425 1430 1435 1440
 AGT TGT TGT CAT TCT CTT TGT AGT AGA AAG CAA TTT GAA ACC TAT GAA CCC ATT GAA AAG 4380
 S C C H S L C S R R Q F E T Y E P I E N
 1445 1450 1455 1460
 GTT CAC ATT CAT
 V H I E

に示されるネコ伝染性腹膜炎 I 型ウイルスのスパイク蛋白質遺伝子 RNA に対応する DNA において、その塩基配列の全長または一部の長さを持つことを特徴とするネコ伝染性腹膜炎 I 型ウイルスのスパイク蛋白質遺伝子 R

NA に対応する DNA。

【請求項 2】 下記の配列

【化 5】

9	10
ATG ATA TTC ATA ATA CTT ACA CTC CTT AGC GTT GCC AAG TCT GAA GAC GCT CTT CAT GGT 60	
M I F I I L T L L S V A K S E D A P H G	
5 10 15 20	
GTC ACC TTA CCC CAA TTT AAT AGC TCC CAT AAC AAT GAA AGG TTT GAA CTT AAT TTC TAC 120	
V T L P Q F N T S H N N E R F E L N F Y	
25 30 35 40	
AAT TTC TTA CAA ACT TGG GAT ATA CCA CCA AAC ACA GAA ACC ATT CTA GGA GGT TAT CTG 180	
N F L Q T W D I P P N T E F I L G G Y L	
45 50 55 60	
CCT TAT TGT GGA GCA GGG GTT AAT TGT GGG TGG TAT AAT TTT AGT CAA AGT GTG GGA CAA 240	
P Y C G A G V N C G W Y N F S Q S V G Q	
65 70 75 80	
AAT GGT AAG TAT GCC TAC ATA AAC ACG CAA AAT CTG AAT ATA CCG AAC GTT CAT GGC GTC 300	
N G X Y A Y I N T Q N L N I P N V H G V	
85 90 95 100	
TAT TTT GAC GTA AGA GAA CAT AAT AAT GAC GGT GAG TGG GAT GAT CGT GAT AAA GTT GGC 360	
Y F D V R E H N N D G E W D D R D K V G	
105 110 115 120	
CTA TTG ATT GCT ATA CAT GGC AAC TCG AAG TAT AGT TTG CTT ATG GTT TTG CAG GAT GCT 420	
L L I A I H G N S K Y S L L M V L Q D A	
125 130 135 140	
GTG GAA GCT AAT CAG CCC CAT GTT GCT GTT AAA ATT TGC CAT TGG AAG CCA GGT AAC ATA 480	
V E A N Q P H V A V K I C H W K P G N I	
145 150 155 160	
AGT TCT TAT CAC GCG TTT AGT GTA AAT CTA GGA GAT GGT GGT CAA TGC GTG TTT AAT CAG 540	
S S Y H A F S V N L G D G G Q C V F N Q	
165 170 175 180	
AGA TTT TCA TTG GAC ACC GTA TTG ACA ACT AAT GAC TTC TAT GGC TTC CAG TGG ACT GAC 600	
R F S L D T V L T T N D F Y G F Q W T D	
185 190 195 200	
ACC TAT GTT GAT ATC TAT CTA GGT GGC ACT ATT ACT AAA GTG TGG GTT GAC AAT GAT TGG 660	
T Y V D I Y L G G T I T K V W V D N D W	
205 210 215 220	
AGC ATT GTT GAA GCT AGC ATC TCC TAT CAT TGG AAT CCG ATT AAC TAT GGA TAT TAC ATG 720	
S I V E A S I S Y H W N R I N Y G Y I H	
225 230 235 240	
CAA TTT GTT AAT CCG ACC ACT TAT TAT GCU TAT AAT AAT ACT GGT GGT GCA AAT TAC ACA 780	
Q F V N R T T Y Y A Y N N T G G A N Y T	
245 250 255 260	
CAA TTG CAG TTA AGC GAA TGC CAT ACT GAT TAT TGT GCT GGC TAT GCT AAG AAT GTC TTT 840	
Q L Q L S E C H T D Y C A G Y A K N V F	
265 270 275 280	
GTG CCT ATA GAT GGT AAA ATA CCA GAA GAC TTC TCC TTT AGT AAC TGG TTT TTA TTG TCA 900	
V P I D G K I P E D F S F S N W F L L S	
285 290 295 300	
GAT AAA TCC ACT TTG GTA CAA GGT CGT GTT CTT AGT AGT CAA CCA GTT TTT GTA CAA TGC 960	
D K S T L V Q G R V L S S Q P V F V Q C	
305 310 315 320	
CIT AGG CCT GTA CCA TCG TGG TCT AAC AAT ACG OCT GTG GTG CAT TTT AAA AAT GAT GCC 1020	
L R P V P S W S N H T A V V H F K N D A	
325 330 335 340	
TTC TGC CCT AAC GTC ACG GCA GAT GTT TTG AGG TTC AAT CTA AAT TTT AGT GAC ACT GAT 1080	
F C P N V T A D V L R P N L N F S D T D	
345 350 355 360	
GTC TAT ACA GAT TCA ACT AAT GAT GAA CAG TTG TTT TTT ACA TTT GAA GAT AAT ACA ACT 1140	
V Y T D S T N D E Q L F F T F E D N T T	
365 370 375 380	
GCC TCC ATA GCC TGT TAT AGC AGT GCC AAT GTC ACT GAT TTT CAG CCT GCA AAT AAT AGT 1200	
A S I A C Y S S A N V T D F Q P A N N S	
385 390 395 400	

11

12

GTC TCT CAC ATT CCA TTT GGC AAA ACT GCG CAT TTC TGT TTT GCC AAT TTT TCT CAT TCA 1206
 V S H I P F G K T A H F C F A N F S H S
 405 410 415 420
 ATT GTG AGC AGA CAG TTT TTG GGC ATA CTT CCA CCA ACT GTT CGA GAG TTT GCA TTT GGC 1320
 I V S R Q F L G I L P P T V R E F A F G
 425 430 435 440
 AGA GAT GGA TCC ATT TTT GTC AAT GGC TAT AAA TAT TTT AGT TTA CCA GCT ATC AGG AGT 1380
 R D G S I F V N G Y K Y F S L P A I R S
 445 450 455 460
 GGT AAC TTC TCC ATC AGT TCA GTA GAG GAG TAT GGC TTT TGG ACC ATA GCC TAT ACT AAC 1440
 V N F S I S S V E E Y G F W T I A Y T N
 465 470 475 480
 TAT ACA GAT GTA ATG GTG GAT GTT AAT GGC ACA GCT ATT ACT AGG CTA TTC TAT TGT GAC 1500
 Y T D V M V D V N G T A I T R L F Y C D
 485 490 495 500
 TCG CCC CTC AAT AGA ATT AAG TGT CAA CAA TTA AAG CAT GAA TTG CCA GAC GGG TTT TAT 1560
 S P L N R I K C Q L K H E L P D G F Y
 505 510 515 520
 TCT GCT AGT ATG CTT GTT AAA AAG GAT TTA CCC AAA ACA TTT GTT ACC ATG CCA CAG TTT 1620
 S A S M L V K K D L P K T Y V T N P Q F
 525 530 535 540
 TAC CAC TGG ATG AAT GTC ACG TTA CAT GTT GTA TTA AAT GAC ACA GAG AAA AAG TAT GAC 1680
 Y H W M N V T L H V V L N D T E K K Y D
 545 550 555 560
 ATC ATT CTC GCT AAA GCC CCT GAG CTA GCA GCA CTC GCG GAT GTA CAT TTT GAA ATA GCT 1740
 I I L A K A P E L A A L A D V H F E I A
 565 570 575 580
 CAG GCT AAC GGC AGT GTA ACT AAT GTT ACT AGC CTA TGT GTC CAA GCA AGA CAG TTG GCT 1800
 Q A N G S V T N V T S L C V Q A R Q L A
 585 590 595 600
 CTA TTT TAT AAG TAT ACT AGC TTA CAA GGT TTG TAT ACT TAT TCT AAC TTA GTG GAG CTA 1860
 L F Y K Y T S L Q G L Y T Y S N L V E L
 605 610 615 620
 CAA AAT TAT GAC TGC CCC TTC TCA CCG CAG CAG TTT AAT AAT TAT TTG CAG TTT GAA ACT 1920
 Q M Y D C P F S P Q Q Y N N Y L Q F E T
 625 630 635 640
 TTA TGT TTT GAT GTG AAC CCT GCT GTG GCA GGT TGT AAG TGG TCG TTA GTT CAT GAT GTC 1980
 L C F D V N P A V A G C K W S L V H D V
 645 650 655 660
 CAG TGG CGT ACG CAG TTC GCC ACC ATT ACG GTT TCT TAT AAA CAT GGT TCT ATG ATC ACT 2040
 Q W R T Q F A T I T V S Y K H G S M I F
 665 670 675 680
 ACC CAT GCC AAG GGG CAC AGT TGG GGT TTT CAA GAT ACC TCT GTT TTG GTA AAA GAT GAA 2100
 T H A K G H S W G F Q D T S V L V K D E
 685 690 695 700
 TGT ACT GAC TAC AAT ATA TAT GGC TTT CAG GGC ACA GGC ATT ATT AGA AAC ACC ACC TCA 2160
 C T D Y N I Y G F Q G T G I I R N T T S
 705 710 715 720
 AGG TTA GTG GCT GGT CTT TAC TAC ACA TCT ATT AGT GGT GAC CTT CTA GCC TTT AAA AAT 2220
 R L V A G L Y Y T S I S G D L L A P K N
 725 730 735 740
 AGT ACT ACT GGT GAG ATT TTC ACT GTA GTG CCA TGT GAT CTA ACA GCA CAA GTA GCT GTG 2280
 S T T G E I F T V V P C D L T A Q V A V
 745 750 755 760
 ATT AAT GAT GAG ATA GTG GGA GCT ATA ACA GCC GTT AAT CAA ACT GAT CTG TTT GAG TTC 2340
 I N D E I V G A I T A V N Q T D L F E F
 765 770 775 780
 GTA AAT AAC ACA CAG GCG AGA AGA TCA CGT AGT TCA ACA CCA AAT TTT GTA ACA TCC TAT 2400
 V N W T Q A R R S R S S T P N F V T S Y
 785 790 795 800

[化7]

13

14

ACT ATG CCA CAA TTT TAT TAC ATA ACA AAA TGG AAT AAT GAC ACA TCG TCC AAT TGT ACA 2460
 T M P Q F Y Y I T K W N N D T S S N C T
 805 810 815 820
 TCT GCC ATT ACC TAC TCC TCT TTT GCT ATT TGT AAT ACT GGT GAG ATT AAA TAT GTT AAT 2520
 S A I T Y S S F A I C N Y G E I K Y V N
 825 830 835 840
 GTC ACT CAT GTT GAA ATT GTG GAT GAT AGT ATA GGC GTT ATT AAA CCT GTT TCA ACA GGT 2580
 V T H V E I V D D S I G V I K P V S T G
 845 850 855 860
 AAC ATA TCG ATA CCT AAA AAC TTC ACT GTC GCA GTA CAA GCT GAA TAC ATT CAG ATT CAA 2640
 N I S I P K N F T V A V Q A E Y I Q I Q
 865 870 875 880
 GTC AAA CCT GTT GTT GTG GAT TGT GCC ACG TAT GTT TGT AAT GGC AAT ACA CAT TGC CTC 2700
 V K P V V V D C A T Y V C E G N T H C L
 885 890 895 900
 AAA TTA CTA ACA CAA TAC ACC TCA GCT TGT CAG ACA ATT GAA AAT GCC CTT AAT CTT GGT 2760
 K L L T O Y T S A C Q T I E N A L N L G
 905 910 915 920
 GCA CGT CTT GAA TCG TTA ATG CTT AAT GAT ATG ATT ACA GTA TCA GAT CGT GGT TTG GAG 2820
 A R L E S L M L N D M I T V S D R G L E
 925 930 935 940
 CTT GCA ACT GTT GAA AGA TTC AAT GCC ACA GCT TTA GGT GGT GAA AAG CTA GGC GGT TTA 2880
 L A T V E R F N A T A L G G E K L G G L
 945 950 955 960
 TAT TTT GAT GGC CTG AGC AGT CTA TTA CCG CCT AAA ATT GGT AAG AGG TCG GCT GTT GAA 2940
 Y F D G L S S L L P P K I G K R S A V E
 965 970 975 980
 GAT CTA TTG TTC AAT AAA GTG GTG ACC AGC GGT CTT GGC ACT GTT GAT GAT GAC TAT AAA 3000
 D L L F N K V V T S G L G T V D D D Y K
 985 990 995 1000
 AAG TGC TCT TCC GGC ACT GAC GTT GCA GAT CTA GTT TGT GCC CAA TAT TAC AAT GGC ATA 3060
 K C S S G T D V A D L V C A Q Y Y N G I
 1005 1010 1015 1020
 ATG GTT TTA CCT GGT GTT GTG GAT GGT AAT AAG ATG TCT ATG TAC ACT GCA TCT TTA ATT 3120
 M V L P G V V D G N K M S N Y T A S L I
 1025 1030 1035 1040
 GGC GGT ATG GCT TTG GGC TCT ATT ACA TCC GCT GTA GCT GTT CCT TTC GCC ATG CAA GTG 3180
 G G N A L G S I T S A V A V P F A M Q V
 1045 1050 1055 1060
 CAG GCG AGG CTT AAT TAT GTC GCA CTA CAA ACT GAT GTT TTG CAG GAG AAC CAA AAA ATA 3240
 Q A R L N Y V A L Q T D V L Q E N Q K I
 1065 1070 1075 1080
 CTT GCT AAT GCC TTT AAT AAT GCC ATT GGT AAC ATT ACA CTA GCG CTT GGA AAA GTT TCT 3300
 L A N A F N N A I G N I T L A L G K V S
 1085 1090 1095 1100
 AAT GCT ATT ACA ACC ACA TCA GAT GGT TTT AAT AGT ATG GCC TCA OCA CTG ACT AAG ATC 3360
 N A I T T T S D G F N S M A S A L T K I
 1105 1110 1115 1120
 CAG AGT GTA GTC AAT CAA CAG GGT GAA GCG TTA AGT CAA CTT ACT AGT CAG TTA CAG AAG 3420
 Q S V V N Q Q G E A L S Q L T S Q L Q R
 1125 1130 1135 1140
 AAC TTT CAG GCT ATC AGC AGT TCC ATT GCT GAA ATT TAT AAT AGG CTG CAG AAG GTG GAA 3480
 N F Q A I S S S I A E I Y N R L E K V E
 1145 1150 1155 1160
 GCT GAT GCC CAA GTT GAC CGT CTC ATT ACT GGT AGA TTG GCA GCA CTT AAT GCT TAT GTG 3540
 A D A Q V D R L I T G R L A A L N A Y V
 1165 1170 1175 1180
 TCT CAA ACT CTA ACT CAG TAT GCT GAA GTC AAG GCC ACT ACC CAA ATT GCA TTG GAG AAA 3600
 S Q T L T Q Y A E V K A S R Q I A L E N
 1185 1190 1195 1200

15	16
GTT AAT GAG TGT GTG AAA TCA CAA TCG AAT AGG TAT GGC TTC TGT GGA AAT GGA ACA CAC 3660	
V N E C V K S Q S N R Y G P C G N G T H	
1205	1210 1215 1220
CTA TTC TCA CTT GTC AAT TCA GCA CCT GAA GGT TTG CTT TTC TTT CAC ACA GTT TTA CTT 3720	
L F S L V N S A P E G L L F F H T V L L	
1225	1230 1235 1240
CCT ACA GAA TGG GAA GAA GTG ACG GCA TGG TCA GGA ATA TGT GTT AAT GAT ACT TAT GCA 3780	
P T E W E E V T A W S G I C V N D T Y A	
1245	1250 1255 1260
TAT GTG TTG AAA GAT TTT GAT CAT TCC ATT TTC AGC TAC AAT GGC ACG TAT ATG GTA ACT 3840	
Y V L K D F D H S I F S Y N G T Y M V T	
1265	1270 1275 1280
CCT CGT AAC ATG TTT CAA CCT AGA AAG CCT CAG ATG AGT GAT TTC GTG CAA ATT ACG AGT 3900	
P R N H F Q P K K P Q M S D F V Q I T S	
1285	1290 1295 1300
TGT GAA GTG ACT TTT TTG AAC ATG ACA TAT ACG ACA TTT CAG GAG ATT GTG ATC GAT TAT 3960	
C E V T F L N M T Y T T Y Q E I V I D Y	
1305	1310 1315 1320
ATT GAT ATT AAC AAG ACT ATC GCT GAT ATG CTT GAA CAA TAC AAT CCT AAT TAC ACA ACT 4020	
I D I N K T I A D N L E Q I N P N Y T T	
1325	1330 1335 1340
CCT GAG CTA AAT CTA CTG CTG GAT ATC TTT AAT CAG ACA AAG TTA AAC CTC ACT GCA GAA 4080	
P E L N L L L D I F N Q T K L N L T A E	
1345	1350 1355 1360
ATA GAC CAA TTG GAA CAA AGA GCT GAC AAC CTC ACT ACT ATA GCA CAT GAG CTA CAG CAG 4140	
I D Q L E Q R A D N L T T I A H E L Q Q	
1365	1370 1375 1380
TAC ATT GAC AAT CTT AAT AAG ACG CTT GTT GAC CTT GAC TGG CTC AAC AGG ATT GAA ACT 4200	
Y I D N L N K T L V D L D W L N R I E T	
1385	1390 1395 1400
TAT GTA AAA TGG CCT TGG TAT GTG TGG TTA CTA ATA GGT TTA GTA GTA GTC TTC TGC ATA 4260	
Y V K W F W Y V W L L I O L V V V F C I	
1405	1410 1415 1420
CCA CTG TTA CTG TTT TGC TGT CTG AGT ACT GGT TTC TGT GGC TGT TTT GGT TGT GTT GGC 4320	
P L L L F C C L S T G F C G C F G C V G	
1425	1430 1435 1440
AGT TGT TGT CAT TCT CTT TGT AGT AGA AGG CAA TTT GAA ACC TAT GAA CCC ATT GAA AAG 4380	
S C C H S L C S R R Q F E T Y E P I E N	
1445	1450 1455 1460
GTT CAC ATT CAT	
V H I H	

に示されるネコ伝染性腹膜炎Ⅰ型ウイルスのスパイク蛋白質であり、そのアミノ酸配列の蛋白質の全長または一部の長さを持つ蛋白質、それらに糖鎖が付加されたポリペプチド。

【請求項3】 ネコ伝染性腹膜炎Ⅰ型ウイルスのスパイク蛋白質遺伝子RNAに対応するDNAであり、請求項2に記載された蛋白質の全部または一部を発現せしめ得るように構築された発現用プラスミドのベクターDNA構造物。

【請求項4】 ネコ伝染性腹膜炎Ⅰ型ウイルスのスパイク蛋白質の全部または一部であり、請求項3記載の発現用ベクターDNAを含む菌あるいは動物の細胞の培養によって生産された蛋白質。

【請求項5】 請求項4で生産された蛋白質を用いて作製したワクチンあるいは診断用の製品。

【請求項6】 アミノ酸配列が図1～図4で示される蛋白質の全長または一部の長さを持つ蛋白質を発現し得るように構築されたプラスミドにより形質転換された形質転換体。

【請求項7】 形質転換体が微生物あるいは動物細胞である請求項6記載の形質転換体。

【請求項8】 微生物がE. coliである請求項6記

載の形質転換体。

【請求項9】 微生物が酵母である請求項6記載の形質転換体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、ネコ伝染性腹膜炎を起こす原因となるウイルスのうちⅠ型ウイルスの外被膜に存在する表面抗原であるスパイク蛋白質遺伝子RNAに対応するDNAとその塩基配列に関する。さらにまた、そのDNA塩基配列によりコードされるスパイク蛋白質に関する。

【0002】 本明細書において、アミノ酸の略号は下記の通りである。

A：アラニン
C：システイン
D：アスパラギン酸
E：グルタミン酸
F：フェニルアラニン
G：グリシン
H：ヒスチジン
I：イソロイシン
K：リジン

L:ロイシン
M:メチオニン
N:アスパラギン
P:プロリン
Q:グルタミン
R:アルギニン
S:セリン
T:スレオニン
V:バリン
W:トリプトファン
Y:チロシン

【0003】

【従来の技術】ネコの伝染性腹膜炎 (Feline Infectious peritonitis, 以下FIPと呼称する) は、多くのネコ科動物に見られる慢性進行性のウイルス性伝染病である。この疾病はコロナウイルスであるFIPウイルス (FIPV) の感染によって起こされ、発症した動物は腹膜炎を主とした症状を示し、腹水貯留により進行性腹位膨満を示す。このような疾病に対する治療法は未だ確立されていないため、発症すれば致死の経過をたどるしかない。

【0004】また、FIPVに対する抗体を保有するネコは、保有しないネコに比べてFIPVの感染およびその発症が早まる抗体依存性の感染及び発症の増強効果が知られている [Pedersenら, Am. J. Vet. Res., 41巻, 868, (1980)]。従って、この点を考慮されていないワクチンが作製されたとしても、そのままでは予防のためには使用できず、却って感染や発症を促進する逆効果の危険を生ずるという困難な面を持っている。

【0005】このFIPVは、直径が約100~150 nmでスパイク (S)、メンブラン (M)、ヌクレオキャプシド (N) の3つの主要構造蛋白質を持っている。ウイルスのゲノムは約20,000塩基のプラス鎖の1本鎖RNAである。FIPVは培養細胞における増殖の違いからI型 (増殖が悪い)、II型 (増殖が良い) にそれぞれ分類されている [Pedersenら, Adv. Exp. Med. Biol., 173巻, 365, (1984)]。

【0006】上記のメンブラン (M) とヌクレオキャプシド (N) 蛋白質はI型とII型の間で免疫学的に交差するが、感染の成立に重要な役割を果たすスパイク (S) 蛋白質に関する交差性は殆ど見られなかった。また、FIPを発症したネコの7割は、I型で、残りはII型であった [宝達ら, Arch. Virol., 117巻, 85, (1991)]。

【0007】FIPVのこれまでの研究は、細胞における増殖性が高く、ウイルス材料を入手しやすいII型で進められてきた。II型のスパイク蛋白質遺伝子の塩基配列はすでに決定されている [de Grootら, J. g

en. Virol., 68巻, 2639, (1987)]。一方、I型のFIPVに関してはこれまでのところ遺伝子関係の研究は全くなされていない。免疫学的な研究においてはI型とII型のスパイク蛋白質の交差性は殆どみられなかったことから、それらの遺伝子の塩基配列は非常に異なっていると推定される。従って、その塩基配列から推定されるI型FIPVのスパイク蛋白質のアミノ酸配列は全く新規なものと考えられる。

【0008】

10 【発明が解決しようとする課題】このように、ネコ伝染性腹膜炎を発症したネコの7割を占めるI型FIPVの感染に中心的な役割を果たすスパイク蛋白質の遺伝子に関する研究はこれまで全くなされていなかった。従って、I型FIPVの感染防止、治療に有益なワクチンが望まれていた。それ故、本発明者らはI型FIPVの感染に中心的な役割を果たすスパイク蛋白質の遺伝子に関する研究を行った結果、I型FIPVのスパイク蛋白質のアミノ酸配列を見出すことに成功した。

【0009】本発明の目的はネコ伝染性腹膜炎を起こす原因となるウイルスのうちI型ウイルスの外被膜に存在する表面抗原であるスパイク蛋白質の遺伝子RNAに対応するDNAとその塩基配列を提供することであり、さらにまた、その塩基配列によりコードされるスパイク蛋白質を提供し、I型FIPVの感染防止、治療に有益なワクチンを提供するものである。なお、本発明における実施例で後に示される通り、スパイク蛋白質のアミノ酸配列はI型とII型とでは非常に異なるという結果が得られている。これは免疫学的な交差性より推測されていた結果でもある。

30 【0010】

【課題を解決するための手段】

(1) I型FIPVの培養、ウイルスRNA抽出

本発明では、I型FIPVは本発明者らにより分離されたKU2株を使用した [宝達ら, Vet. Microbiol., 28巻, 13, (1991)]。ウイルスの型の決定はPedersenらの方法 [Adv. Exp. Med. Biol., 173巻, (1984)] に従った。

【0011】ネコ胎児株化細胞の単層培養に約1,000 PFUのKU2ウイルスを感染させ、37℃、7日間培養後、細胞変性を生じた感染細胞を回収し、ホモジェナイザーで細胞を破碎して、3,000 rpm、15分で細胞核を除去した。上清を30%ショ糖に重層して20万×g 2時間でウイルス沈澱を得た。沈澱を0.1M食塩水に溶かしSDSを0.5%、フェノールを等量加えて15,000 rpm、5分で変性蛋白質を除去した。水層にエタノールを加えて冷却しRNAを15,000 rpm、5分で沈澱させて回収した。

【0012】(2) I型FIPVのM遺伝子断片のcDNAクローニングと塩基配列決定

I型のFIPVは感染細胞から遊離した状態で集め難いので、感染細胞を破碎してウイルスを集めなくてはならない。そのため、出発材料中に細胞由来の不純物を含む率がII型ウイルスよりも高い。この点を考慮して、cDNA合成の際には非特異的なランダムプライマーを使用せずに特異的なプライマーを使用する。従って、スパイク遺伝子の下流に存在するI型FIPVのM遺伝子の塩基配列を決定することを最初に行った。

【0013】図5のFIPV遺伝子地図に示す通り、スパイク遺伝子の下流にはメンブランやヌクレオキャプシド遺伝子が存在する。これらがコードするメンブランやヌクレオキャプシド蛋白質はI型とII型で免疫学的によく交差することは上記した通りである。従って、この領域においてII型とI型の塩基配列のホモロジーは高いものと考えられる。なお、II型FIPVのM遺伝子の塩基配列はすでに論文として報告されている〔Vennemaら、Virology, 181巻, 327, (1991)〕ので、これを参考にして下記の+鎖、-鎖の2種類のDNAプライマーを合成する。

【0014】TGGGGATCCGATTTTACGT
AGTAAGCCCA (-)
CAAGAATTTCGTGAACGCTACTGTGC
CATG (+)

これらのプライマーを利用して図6に概略で示した、いわゆるRT (逆転写酵素) -PCR法によりI型FIPVのメンブラン (M) 遺伝子断片のcDNAを増幅して、それをクローニングし (図8におけるクローン1)、その塩基配列を決定した。

【0015】(3) スパイク蛋白質遺伝子のcDNAクローニング

上記した(2)で得られたI型FIPVのM遺伝子断片の塩基配列を参考にして、それと相補性を持つ(マイナス鎖)プライマーDNAである、CGAAGAATTCATATCTGGAACTTGGTACTC (-) を合成した。これを用いて、図7に概略を示した方法により、スパイク蛋白質遺伝子RNAのcDNAクローニングと塩基配列の決定を行った。

【0016】この場合、基本的方法は前述の(2)と同様であるが、5'末端側の塩基配列が未知であるため、cDNAにpolydAテイルを付加しておき、オリゴdTプライマー、CTGTGAATTCTGCAGGATCCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTをプラス鎖プライマーとして加えて、図6に概略で示した、いわゆるRT (逆転写酵素) -PCR法によりI型FIPVの遺伝子断片のcDNAを増幅して、それをクローニングし (図8におけるクローン2)、その塩基配列を決定した。下流の3'末端側塩基配列を決定することで、該当するcDNAクローンがFIPVの遺伝子断片であることが確認される。又、上流5'末端側の塩基配列は未知のスパイク蛋白質側の塩基配列となる。

【0017】得られた5'末端側の塩基配列を参考にして、さらにマイナス鎖プライマーDNAを合成し、以降この方法を4回繰り返すことによって図8に示すようなI型FIPVのスパイク蛋白質遺伝子の全領域をカバーするcDNAクローンを取得でき、それらの塩基配列を決定することにより、I型FIPVスパイク蛋白質遺伝子の全塩基配列を決定することができた。

【0018】(4) 組替え型I型スパイク蛋白質の発現
上記した(3)のI型スパイク蛋白質遺伝子の塩基配列を参考にして、任意の領域においてプラス鎖とマイナス鎖の1組のプライマーを合成して、PCRを行えばその領域の遺伝子断片を増幅することができる。これらには必要ならば、開始コドン(ATG)や終了コドン(TGAなど)、あるいは制限酵素部位などを含ませることができる。こうして増幅された遺伝子断片は、公知の大腸菌、酵母、バキュロウイルス、ワクシニアウイルスなどの発現用ベクターに結合させて発現させることが可能である。

【0019】

【実施例】以下に本発明の実施例を具体的に説明するが、本発明はこれにより制限されるものでないことはいうまでもまない。

実施例1

I型FIPVスパイク蛋白質遺伝子の塩基配列の決定：
本発明においては、I型FIPVであるKU2株ウイルスを使用して、上記(2)、(3)で概略を示した方法により、I型のスパイク蛋白質遺伝子のcDNAクローニングと塩基配列の決定を行った。

【0020】本実施例においては、cDNA合成の際に非特異的なランダムプライマーを使用せずに特異的なプライマーを使用した。そのためにはスパイク遺伝子の下流に存在するI型FIPVのM遺伝子の塩基配列の決定をまず行った。図5のFIPV遺伝子地図に示すとおり、スパイク遺伝子の下流にはメンブラン (M) やヌクレオキャプシド (N) 遺伝子が存在する。

【0021】これらがコードするメンブランやヌクレオキャプシド蛋白質はI型とII型で免疫学的に良く交差することは上述した通りであるため、この領域においてはI型とII型の塩基配列のホモロジーは高いはずである。II型のFIPVのメンブラン遺伝子の塩基配列はすでに報告されている〔Vennemaら、Virology, 181巻, p327, (1991)〕ので、これを参考にして2種類のDNAプライマーを合成した。それらの塩基配列は下記の通りである。

【0022】TGGGGATCCGATTTTACGT
AGTAAGCCCA (-)
CAAGAATTTCGTGAACGCTACTGTGC
CATG (+)

これらのDNAプライマーを利用して図6に概略で示した方法によりI型FIPVのM遺伝子断片のcDNAク

ローニングと塩基配列を決定した。まず、I型FIPV-RNAにプライマー、TGGGGATCCGATTTTACGTAGTAAGCCCA (マイナス鎖) を加え、逆転写酵素によりI型FIPVのcDNAを合成する。

【0023】そして、その一部を取り、PCR用反応液 (ペーリンガー社製) と上記したマイナス鎖とプラス鎖のプライマーを加えてPCRを行い、メンブラン遺伝子のDNA断片を増幅した。これをプラスミドベクターpUC18のBamHI、EcoRI部位にT4DNAライゲースで結合させ、カルシウムで処理された大腸菌HB101の菌液に加えてcDNAをクローニングした。このcDNAの塩基配列はABI (アプライドバイオシステム社) のシークエンス用キットを用い、自動塩基配列決定機 (アプライドバイオシステム社製) により決定した。この決定に際しては、アプライドバイオシステム社から市販されている塩基配列用のキットに記載された蛍光プライマー法に従った。

【0024】ここでは、Sangerらによるジデオキシ法 (Pro. N. A. S., 74巻, p5463 (1971)) を基本として、この方法で使用されるM13プライマーをA、C、G及びTをそれぞれ識別できるように蛍光標識させたものである。標識されたDNAを電気泳動にかけて塩基配列を決定する工程では、アプライドバイオシステム社製の自動塩基配列決定機373Aを使用して行った。このようにして、決定されたI型FIPVのメンブラン遺伝子断片の塩基配列をもとにして、それと相補性を持つ (マイナス鎖) プライマーDNA、すなわちCGAAGAATTCATATCTGGAAACCTTGCTACTCをあらたに合成した。

【0025】このプライマーを用いて、図7に概略を示した方法により、スパイク蛋白質遺伝子RNAのcDNAクローニングと塩基配列の決定を行った。メンブラン遺伝子の場合と同様に、I型ウイルスRNAにプライマー、すなわちTGGGGATCCGATTTTACGTAGTAAGCCCA (-) を加えて、逆転写酵素でcDNAを合成する。これに2M NaOHを1/10量加えて60℃、1時間でFIPV-RNAを分解して合成された一本鎖のcDNAを回収する。

【0026】このcDNAの3'末端に末端転位酵素 (TdT) でpolydA鎖を付加して、プライマー、すなわちCGAAGAATTCATATCTGGAAACCTTGCTACTC (-) とオリゴdTプライマー、すなわちCTGTGAATTCCTGCAGGATCCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT (+) を用いてPCRを行った。

【0027】そして、増幅したDNAを低融点アガロース電気泳動にかけて、1kbより長いDNA分画を回収した。これを制限酵素EcoRIで切断し、プラスミドベクターのpUC18のEcoRI部位にクローニング

して、塩基配列を決定した。この場合、3'末端側であるプライマー、CGAAGAATTCATATCTGGAACCTTGCTACTC (-) 側の塩基配列を決定することで、該当するcDNAクローンがFIPVの遺伝子断片であることが確認され、また、5'末端側であるプライマー、すなわちCTGTGAATTCCTGCAGGATCCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT側の塩基配列は未知のスパイク蛋白質遺伝子側の塩基配列となる。

10 【0028】これを基にして、更に下記のマイナス鎖プライマー、すなわち

GACTCTTCAATATCCAGCTGAA (-)、
GGGAATTCAGAGGTAAATAATACTTTAAGTG (-)

を合成した。以降まったく同様にしてこの方法を4回繰り返すことによって、図8に示すようなI型FIPVのスパイク蛋白質遺伝子の全領域をカバーするcDNAクローンを取得でき、それらの塩基配列を決定することで、I型FIPVスパイク蛋白質遺伝子の全塩基配列を決定することができた。

【0029】図1~図4にI型FIPVのスパイク蛋白質遺伝子に対応するDNAの塩基配列とそれによりコードされるアミノ酸配列とを示す。これらは免疫学的な交差性から予想された通りde Grootらによりすでに報告されているII型FIPVのもの (J. gen. Virol., 68巻, p2639 (1987)) とは非常に異なるものであった。スパイク蛋白質をコードする遺伝子は4392塩基長 (1464アミノ酸残基) である。

【0030】I型とII型のスパイク蛋白質のアミノ酸配列のコンピューター解析を行って比較すると、全体でのホモロジーは約60%であったが、ウイルスの感染に必要な役割を持つと考えられるスパイク蛋白質の頭部にあたるN末端側の方が、その部分をウイルスの外被膜に固定させる役割を持つと考えられているC末端側よりホモロジーは低くそれぞれ31%、及び60%であり、その中でも276個のアミノ酸配列では17%と全く異なっていた。

40 【0031】実施例2

スパイク蛋白質の発現：実施例1で得たスパイク蛋白質のN末端側の276アミノ酸残基の配列は、I型とII型とでは全く異なることが明らかとなったので、この領域のペプチドは両型を識別する抗原として最も有用なものとなり得ると考えられる。そこで、この領域のペプチドの発現を大腸菌の発現ベクターpGEX-2T (図9) を用いて行った。そのため、まず、図1におけるアミノ酸配列番号33~276のペプチドを発現させる遺伝子断片をPCRで増幅させるため以下のDNAプライマーを合成した。

CCCGGATCCGAAAGGTTTGAACCTTA
ATTTTC (+)
CCCGAATTCTCTAAGCATAGCCAGCA
CAAT (-)

【0032】 これらをプライマーとして、図8におけるクローン5のcDNAを鋳型としてPCRを行い、目的とする遺伝子断片を増幅させた。低融点アガロース電気泳動により精製したDNAを制限酵素BamHI、EcoRIで切断し、同じ制限酵素で切断したpGEX-2T (図9) にT4DNAライゲースで結合させ、カルシウム処理した大腸菌JM105株に加えて、このペプチドを発現し得る菌株I-N244を得た。さらにJM105、pGEX-2Tベクターだけを含む菌株を対象として用意した。

【0033】 これらに対数増殖期まで培養してイソプロピルチオガラクトシド (IPTG) を1mMとなるように加えて、目的蛋白質を発現させた。これらをSDS-10%ポリアクリルアミド電気泳動にかけてクマシー色素で染色させた。その結果を図10に示した。図10において、レーンの4にI-244の目的ペプチドが発現されていることが確認できた。

【0034】

【発明の効果】 未知であったI型FIPVのスパイク遺伝子の塩基配列が本発明により初めて決定され、そし

て、それは既に知られていたII型のものと非常に異なることが明らかとなった。このことは、ネコ伝染性腹膜炎の感染を防御するためにすでに知られていたII型ウイルスのワクチンだけでは不十分であることを示している。しかも発症したネコを調べた場合、I型の割合が7割を占めていることから、I型ウイルスの感染を防ぐことが非常に重要であり、これは本発明により解決し得ることが認められた。

【0035】 また、スパイク蛋白質のN末端におけるI型とII型では全くホモロジーのない領域をコードしているI型のペプチドを発現することができ、II型についても同様な手法を実行すれば相当するII型のペプチドを発現できるため、両者を識別する最も有用な抗原として診断等に適用すればその効果が発揮される。

【0036】

【配列表】

【0037】 配列の長さ: 4392

配列の型: DNA

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

起源

生物名: ネコ伝染性腹膜炎ウイルス

配列

【化9】

25

26

ATG ATA TTC ATA ATA CTT ACA CTC CTT AGC GTT GCC AAG TCT GAA GAC GCT CCT CAT GGT	60
N I F I I L T L L S V A K S E D A P H G	
5 10 15 20	
GTC ACC TTA CCC CAA TTT AAT ACG TCC CAT AAC AAT GAA AGG TTT GAA CTT AAT TTC TAC	120
V T L P Q F N T S H N N E R F E L N F Y	
25 30 35 40	
AAT TTC TTA CAA ACT TGG GAT ATA CCA CCA AAC ACA GAA ACC ATT CTA GGA GGT TAT CTG	180
N F L Q T W D I P P N T E T I L Q G Y L	
45 50 55 60	
CCT TAT TGT GGA GCA GGG GTT AAT TGT GGG TGG TAT AAT TTT AGT CAA AGT GTG GGA CAA	240
P Y C G A G V N C G W Y N F S Q S V G Q	
65 70 75 80	
AAT GGT AAG TAT GCC TAC ATA AAC ACG CAA AAT CTG AAT ATA CCG AAC GTT CAT GGC GTC	300
N G K Y A Y I N T Q N L N I P N V H G V	
85 90 95 100	
TAT TTT GAC GTA AGA GAA CAT AAT AAT GAC GGT GAG TGG GAT GAT CGT GAT AAA GTT GGC	360
Y F D V R E H N N D G E W D D R D K V G	
105 110 115 120	
CTA TTG ATT GCT ATA CAT GGC AAC TCG AAG TAT AGT TTG CTT ATG GTT TTG CAG GAT GCT	420
L L I A I H G N S K Y S L L M V L Q D A	
125 130 135 140	
GTG GAA GCT AAT CAG CCC CAT GTT GCT GTT AAA ATT TGC CAT TGG AAG CCA GGT AAC ATA	480
V E A N Q P H V A V K I C H W K P G W I	
145 150 155 160	
AGT TCT TAT CAC GCG TTT AGT GTA AAT CTA GGA GAT GGT GGT CAA TGC GTG TTT AAT CAG	540
S S Y H A F S V N L G D G G Q C V F N Q	
165 170 175 180	
AGA TTT TCA TTG GAC ACC GTA TTG ACA ACT AAT GAC TTC TAT GGC TTC CAG TGG ACT GAC	600
R F S L D T V L T T N D F Y G F Q W T D	
185 190 195 200	
ACC TAT GTT GAT ATC TAT CTA GGT GGC ACT ATT ACT AAA GTG TGG GTT GAC AAT GAT TGG	660
T Y V D I Y L G G T I T K V W V D N D W	
205 210 215 220	
AGC ATT GTT GAA GCT AGC ATC TCC TAT CAT TGG AAT CGG ATT AAC TAT GGA TAT TAC ATG	720
S I V E A S I S Y R W N R I N Y G Y Y M	
225 230 235 240	
CAA TTT GTT AAT CCG ACC ACT TAT TAT GCG TAT AAT AAT ACT GGT GGT GCA AAT TAC ACA	780
Q F V N R T T Y Y A Y N N T G G A N Y T	
245 250 255 260	
CAA TTG CAG TTA AGC GAA TGC CAT ACT GAT TAT TGT GCT GGC TAT GCT AAG AAT GTC TTT	840
Q L Q L S E C H T D Y C A G Y A K N V F	
265 270 275 280	
GTG CCT ATA GAT GGT AAA ATA CCA GAA GAC TTC TCC TTT AGT AAC TGG TTT TTA TTG TCA	900
V P I D G K I P E D F S F S N W F L L S	
285 290 295 300	
GAT AAA TCC ACT TTG GTA CAA GGT CGT GTT CTT AGT AGT CAA CCA GTT TTT GTA CAA TGC	960
D K S T L V Q G R V L S S Q P V F V Q C	
305 310 315 320	
CTT AGG CCT GTA CCA TCG TGG TCT AAC AAT ACG GCT GTG GTG CAT TTT AAA AAT GAT GCC	1020
L R P V P S W S N H T A V V H F K N D A	
325 330 335 340	
TTC TGC CCT AAC GTC ACG GCA GAT GTT TTG AGG TTC AAT CTA AAT TTT AGT GAC ACT GAT	1080
F C P N V T A D V L R F N L N F S D T D	
345 350 355 360	
GTC TAT ACA GAT TCA ACT AAT GAT GAA CAG TTG TTT TTT ACA TTT GAA GAT AAT ACA ACT	1140
V Y T D S T N D E Q L F F T F E D N T T	
365 370 375 380	
GCC TCC ATA GCC TGT TAT AGC AGT GCC AAT GTC ACT GAT TTT CAG CCT CCA AAT AAT AGT	1200
A S I A C Y S S A N V T D F Q P A N N S	
385 390 395 400	

[410]

27

28

GTC TCT CAC ATT CCA TTT GGC AAA ACT GCG CAT TTC TGT TTT GCC AAT TTT TCT CAT TCA 1206
 V S H I P P G K T A H F C P A N P S H S
 405 410 415 420
 ATT GTG AGC AGA CAG TTT TTG GGC ATA CTT CCA CCA ACT GTT CGA GAG TTT GCA TTT GGC 1320
 I V S R Q P L G I L P P T V R E F A F G
 425 430 435 440
 AGA GAT GGA TCC ATT TTT GTC AAT GGC TAT AAA TAT TTT AGT TTA CCA GCT AFC AGG AGT 1380
 R D G S I F V N G Y K Y F S L P A I R S
 445 450 455 460
 GTT AAC TTC TCC ATC AGT TCA GTA GAG GAG TAT GGC TTT TGG ACC ATA GCC TAT ACT AAC 1440
 V N F S I S S V E E Y G F W T I A Y T N
 465 470 475 480
 TAT ACA GAT GTA ATG GTG GAT GTT AAT GGC ACA GCT ATT ACT AGG CTA TTC TAT TGT GAC 1500
 Y T D V N V D V N G T A I T N L F Y C D
 485 490 495 500
 TCG CCC CTC AAT AGA ATT AAG TGT CAA CAA TTA AAG CAT GAA TTG CCA GAC GGG TTT TAT 1560
 S P L N R I K C Q Q L K H E L P D G F Y
 505 510 515 520
 TCT GCT AGT ATG CTT GTT AAA AAG GAT TTA CCC AAA ACA TTT GTT ACC ATG CCA CAG TTT 1620
 S A S M L V K K D L P K T F V T N P Q F
 525 530 535 540
 TAC CAC TGG ATG AAT GTC ACG TTA CAT GTT GTA TTA AAT GAC ACA GAG AAA AAG TAT GAC 1680
 Y H W M N V T L H V V L N D T E K K Y D
 545 550 555 560
 ATC ATT CTC GCT AAA GCC CCT GAG CTA GCA GCA CTC GCG GAT GTA CAT TTT GAA ATA GCT 1740
 I I L A K A P E L A A L A D V H F E I A
 565 570 575 580
 CAG GCT AAC GGC AGT GTA ACT AAT GTT ACT AGC CTA TGT GTC CAA GCA AGA CAG TTG GCT 1800
 Q A N G S V T N V T S L C V Q A R Q L A
 585 590 595 600
 CTA TTT TAT AAG TAT ACT AGC TTA CAA GGT TTG TAT ACT TAT TCT AAC TTA GTG GAG CTA 1860
 L F Y K Y T S L Q G L Y T Y S N L V E L
 605 610 615 620
 CAA AAT TAT GAC TGC CCC TTC TCA CCG CAG CAG TTT AAT AAT TAT TTG CAG TTT GAA ACT 1920
 Q N I D C P F S P Q Q F N N Y L Q F E T
 625 630 635 640
 TTA TGT TTT GAT GTG AAC CCT GCT GTG GCA GGT TGT AAG TGG TCG TTA GTT CAT GAT GTC 1980
 L C F D V N P A V A G C K W S L V H D V
 645 650 655 660
 CAG TGG CGT ACG CAG TTC GCC ACC ATT ACG GTT TCT TAT AAA CAT GGT TCT ATG ATC ACT 2040
 Q W R T Q F A T I T V S Y K H G S M I T
 665 670 675 680
 ACC CAT GCC AAG GCG CAC AGT TGG GGT TTT CAA GAT ACC TCT GTT TTG CTA AAA GAT GAA 2100
 T H A K G H S W G F Q D T S V L V K D E
 685 690 695 700
 TGT ACT GAC TAC AAT ATA TAT GGC TTT CAG GGC ACA GGC ATT ATT AGA AAC ACC ACC TCA 2160
 C T D Y N I Y G P Q G T G I I R N T T S
 705 710 715 720
 AGG TTA GTG GCT GGT CTT TAC TAC ACA TCT ATT AGT GGT GAC CTT CTA GCC TTT AAA AAT 2220
 R L V A G L Y Y T S I S G D L L A F K N
 725 730 735 740
 AGT ACT ACT GGT GAG ATT TTC ACT GTA GTG CCA TGT GAT CTA ACA GCA CAA GTA GCT GTG 2280
 S T T G E I F T V V P C D L T A Q V A V
 745 750 755 760
 AAT AAT GAT GAG ATA GTG GGA GCT ATA ACA GCC GTT AAT CAA ACT GAT CTG TTT GAG TTC 2340
 I N D E I V G A I T A V N Q T D L F E F
 765 770 775 780
 GTA AAT AAC ACA CAG GCG AGA AGA TCA CGT AGT TCA ACA CCA AAT TTT GTA ACA TCC TAT 2400
 V N N T Q A R R S R S S T P N F V T S Y
 785 790 795 800

[411]

29

30

ACT ATG CCA CAA TTT TAT TAC ATA ACA AAA TGG AAT AAT GAC ACA TCG TCC AAT TGT ACA 2450
 T M P Q F Y Y I T K W N N D T S S N C T
 805 810 815 820
 TCT GCC ATT ACC TAC TCC TCT TTT GCT ATT TGT AAT ACT GGT GAG ATT AAA TAT GTT AAT 2520
 S A I T Y S S P A I C N T G E I K Y V H
 825 830 835 840
 GTC ACT CAT GTT GAA ATT GTG GAT GAT AGT ATA GGC GTT ATT AAA CCT GTT TCA ACA GGT 2580
 V T H V E I V D D S I G V I K P V S T G
 845 850 855 860
 AAC ATA TCG ATA CCT AAA AAC TTC ACT GTC GCA GTA CAA GCT GAA TAC ATT CAG ATT CAA 2640
 N I S I P K N F T V A V Q A E Y I Q I Q
 865 870 875 880
 GTC AAA CCT GTT GTT GTG GAT TGT GCC ACG TAT GTT TGT AAT GGC AAT ACA CAT TGC CTC 2700
 V R P V V V D C A T I V C H G H T H C L
 885 890 895 900
 AAA TTA CTA ACA CAA TAC ACC TCA GCT TGT CAG ACA ATT GAA AAT GCC CTT AAT GTT 2760
 K L L T Q Y T S A C Q T I E N A L N L G
 905 910 915 920
 GCA CGT CTT GAA TCG TTA ATG CTT AAT GAT ATG ATT ACA GTA TCA GAT CGT GGT TTG GAG 2820
 A R L E S L N L N D M I T V S D R S L E
 925 930 935 940
 CTT GCA ACT GTT GAA AGA TTC AAT GCC ACA GCT TTA GGT GGT GAA AAG CTA GGC GGT TTA 2880
 L A T V E R F N A T A L G G E H L G G L
 945 950 955 960
 TAT TTT GAT GGC CTG AGC AGT CTA TTA CCG CCT AAA ATT GGT AAG AGG TCG GCT GTT GAA 2940
 Y F D G L S S L L P P K I G K R S A V E
 965 970 975 980
 GAT CTA TTT TTC AAT AAA GTG GTG ACC AGC GGT CTT GGC ACT GTT GAT GAT GAC TAT AAA 3000
 D L L F N H V V T S G L G T V D D D Y K
 985 990 995 1000
 AAG TGC TCT TCC GGC ACT GAC GTT GCA GAT CTA GTT TGT GCC CAA TAT TAC AAT GGC ATA 3060
 K C S S G T D V A D L V C A Q Y Y N G I
 1005 1010 1015 1020
 ATG GTT TTA CCT GGT GTT GTG GAT GGT AAT AAG ATG TCT ATG TAC ACT GCA TCT TTA ATT 3120
 M V L P G V V D G H K M S H Y T A S L I
 1025 1030 1035 1040
 GGC GGT ATG GCT TTG GGC TCT ATT ACA TCC GCT GTA GCT GTT CCT TTC GCC ATG CAA GTG 3180
 G G M A L G S I T S A V A V P F A M Q V
 1045 1050 1055 1060
 CAG GCG AGG CTT AAT TAT GTC GCA CTA CAA ACT GAT GTT TTG CAG GAG AAC CAA AAA ATA 3240
 Q A R L N Y V A L Q T D V L Q E N Q K I
 1065 1070 1075 1080
 CTT GCT AAT GCC TTT AAT AAT GCC ATT GGT AAC ATT ACA CTA GCG CTT GGA AAA GTT TCT 3300
 L A N A F H N A I G N I T L A L G K V S
 1085 1090 1095 1100
 AAT GCT ATT ACA ACC ACA TCA GAT GGT TTT AAT AGT ATG GCC TCA GCA CTG ACT AAG ATC 3360
 N A I T T T S D G F H S M A S A L T K I
 1105 1110 1115 1120
 CAG AGT GTA GTC AAT CAA CAG GGT GAA GCG TTA AGT CAA CTT ACT AGT CAG TTA CAG AAG 3420
 Q S V V H Q Q G E A L S Q L T S Q L Q K
 1125 1130 1135 1140
 AAC TTT CAG GCT ATC AGC ACT TCC ATT GCT GAA ATT TAT AAT AGG CTG GAG AAG GTG GAA 3480
 H F Q A I S S S I A E I Y H R L E K V E
 1145 1150 1155 1160
 GCT GAT GCC CAA GTT GAC CGT CTC ATT ACT GGT AGA TTG GCA GCA CTT AAT GCT TAT GTG 3540
 A D A Q V D R L I T G R L A A L N A Y V
 1165 1170 1175 1180
 TCT CAA ACT CTA ACT CAG TAT GCT GAA GTC AAG GCT AGT ACG CAA ATT GCA TTG CAG AAA 3600
 S Q T L T Q Y A E V X A S R Q I A L E K
 1185 1190 1195 1200

[121]

31

32

```

GTT AAT GAG TGT GTG AAA TCA CAA TCG AAT AGG TAT GGC TTC TGT GGA AAT GGA ACA CAC 3650
V N E C V K S Q S N R Y G F C G N G T H
1205 1210 1215 1220
CTA TTC TCA CTT GTC AAT TCA GCA CCT GAA GGT TTG CTT TTC TTT CAC ACA GTT TTA CTT 3720
L F S L V N S A P E G L L F F H T V L L
1225 1230 1235 1240
CCT ACA GAA TGG GAA GAA GTG ACG GCA TGG TCA GGA ATA TGT GTT AAT GAT ACT TAT GCA 3780
P T E N E E V T A W S G I C V N D T Y A
1245 1250 1255 1260
TAT GTG TTG AAA GAT TTT GAT CAT TCC ATT TTC AGC TAC AAT GGC ACG TAT ATG GTA ACT 3840
Y V L K D F D H S I F S Y N G T Y M V T
1265 1270 1275 1280
CCT CGT AAC ATG TTT CAA CCT AGA AAG CCT CAG ATG AGT GAT TTC GTG CAA ATT ACG AGT 3900
P R N M F Q P R K P Q M S D F V Q I T S
1285 1290 1295 1300
TGT GAA GTG ACT TTT TTG AAC ATG ACA TAT ACG ACA TTT CAG GAG ATT GTG ATC GAT TAT 3960
C E V T F L N M T Y X T F Q E I V I D Y
1305 1310 1315 1320
ATT GAT ATT AAC AAG ACT ATC GCT GAT ATG CTT GAA CAA TAC AAT CCT AAT TAC ACA ACT 4020
I D I N K T I A D M L E Q Y N P N Y T T
1325 1330 1335 1340
CCT GAG CTA AAT CTA CTG CTG GAT ATC TTT AAT CAG ACA AAG TTA AAC CTC ACT GCA GAA 4080
P E L N L L L D I Y N Q T K L N L T A E
1345 1350 1355 1360
ATA GAC CAA TTG GAA CAA AGA GCT GAC AAC CTC ACT ACT ATA GCA CAT GAG CTA CAG CAG 4140
I D Q L E Q R A D N L T T I A H E L Q Q
1365 1370 1375 1380
TAC ATT GAC AAT CTT AAT AAG ACG CTT GTT GAC CTT GAC TGG CTC AAC AGG ATT GAA ACT 4200
Y I D N L N K T L V D L D W L N R I E T
1385 1390 1395 1400
TAT GEA AAA TGG CCT TGG TAT GTG TGG TTA CTA ATA GGT TTA GTA GTA GTC TTC TGC ATA 4260
Y V N W P W Y V W L L I O L V V V F C I
1405 1410 1415 1420
CGA CTG TTA CTG TTT TGC TGT CTG AGT ACT GGT TTC TGT GGC TGT TTT GGT TGT GTT GGC 4320
P L L L F C C L S T G F C G C F G C V G
1425 1430 1435 1440
AGT TGT TGT CAT TCT CTT TGT AGT AGA AGG CAA TTT GAA ACC TAT GAA CCC ATT GAA AAG 4380
S C C H S L C S R R Q F E T Y E P I E K
1445 1450 1455 1460
GTT CAC ATT CAT
V H I H

```

【図面の簡単な説明】

【図1】 I型FIPVスパイク蛋白質遺伝子の塩基配列と、それによりコードされるアミノ酸配列とを示すものである。

【図2】 図1に続くI型FIPVスパイク蛋白質遺伝子の塩基配列と、それによりコードされるアミノ酸配列とを示すものである。

【図3】 図2に続くI型FIPVスパイク蛋白質遺伝子の塩基配列と、それによりコードされるアミノ酸配列とを示すものである。

【図4】 図3に続くI型FIPVスパイク蛋白質遺伝子の塩基配列と、それによりコードされるアミノ酸配列とを示すものである。

【図5】 FIPVのウイルス構成蛋白質遺伝子に関する遺伝子地図である。

【図6】 メンブラン遺伝子断片をRT（逆転写酵素）-PCR法によるcDNAクローニングの工程の概略である。

【図7】 スパイク蛋白質遺伝子をTdT（末端転位酵素）を用いてpolydA鎖を付加してPCRをかける方法による、cDNAクローニングの工程の概略である。

【図8】 本発明で取得されたcDNAを遺伝子地図上に配置させたものである。

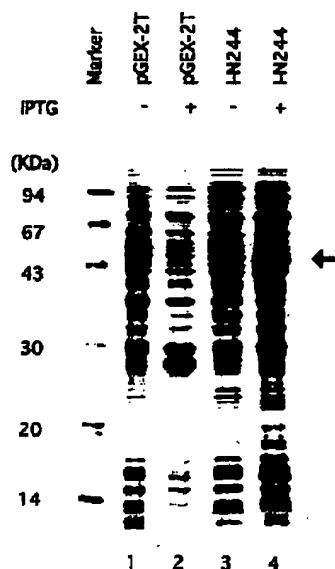
【図9】 大腸菌における発現ベクターpGEX-2Tの遺伝子地図である。

【図10】 実施例2においてI型およびII型のスパイク蛋白質の一部の領域をpGEX-2Tを用いて発現されていることを、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動により確認した結果である。

【図1】

ATG ATA TTC ATA ATA CTT ACA CTC CTT AGC GTC CCC AAG TCT GAA GAC GCT CCT CAT GGT 60
 M I F I I L T L L S V A K S E D A P R G
 5 10 15 20
 GTC ACC TTA CCC CAA TTT AAT ACG TCG CAT AAC AAT GAA AGG TTT GAA CTT AAT TTC TAC 120
 V T L P Q F N T S H N N E R F E L N F Y
 25 30 35 40
 AAT TTC TTA CAA ACT TGG GAT ATA CCA CCA AAC ACA GAA ACC ATT CTA GGA GGT TAT CTG 180
 N F L Q T W D I P P N T E T I L G G Y L
 45 50 55 60
 CCT TAT TGT CGA GCA GGG GTT AAT TGT GGG TGG TAT AAT TTT AGT CAA AGT GTG GGA CAA 240
 P Y C G A G V N C G W Y N F S Q S V G Q
 65 70 75 80
 AAT GGT AAG TAT GCC TAC ATA AAC ACG CAA AAT CTG AAT ATA CCG AAC GTT CAT GGC GTC 300
 N G K Y A Y I N T Q N L N I P N V H G V
 85 90 95 100
 TAT TTT GAC GTA AGA GAA CAT AAT AAT GAC GGT GAG TCG GAT GAT GGT GAT AAA GTT GGC 360
 Y F D V R E H N N D G E W D D R D K V G
 105 110 115 120
 CTA TTG ATT GCT ATA CAT GGC AAC TCG AAG TAT AGT TTG CTT ATG GTT TTG CAG GAT GCT 420
 L L I A I H G N S K Y S L L M V L Q D A
 125 130 135 140
 GTG GAA GCT AAT CAG CCC CAT GTT GCT GTT AAA ATT TCG CAT TGG AAG CCA GGT AAC ATA 480
 V E A N G P H V A V K I C E W K P G N I
 145 150 155 160
 AGT TCT TAT CAC GCG TTT AGT GTA AAT CTA GGA GAT GGT GGT CAA TGC GTG TTT AAT CAG 540
 S S Y H A F S V N L G D G G Q C V F N Q
 165 170 175 180
 AGA TTT TCA TTG GAC ACC GTA TTG ACA ACT AAT GAC TTC TAT GGC TTC CAG TGG ACT GAC 600
 R F S L D T V L T T N D F Y G F Q W T D
 185 190 195 200
 ACC TAT GTT GAT ATC TAT CTA GCT GGC ACT ATT ACT AAA GTG TGG GTT GAC AAT GAT TGG 660
 T Y V D I Y L G G T I T K V W V D H D W
 205 210 215 220
 AGC ATT GTT GAA GCT AGC ATC TCG TAT CAT TCG AAT CCG ATT AAC TAT GGA TAT TAC ATG 720
 S I V E A S I S Y H W N R I N Y G Y Y M
 225 230 235 240
 CAA TTT GTT AAT CCC ACC ACT TAT TAT GCG TAT AAT AAT ACT GGT GGT GCA AAT TAC ACA 780
 Q F V H R T T Y Y A Y N N T G G A N Y T
 245 250 255 260
 CAA TTG CAG TTA AGC GAA TGC CAT ACT GAT TAT TGT GCT GGC TAT GCT AAG AAT GTC TTT 840
 Q L Q L S E C H T D Y C A G Y A K N V F
 265 270 275 280
 GTG CCT ATA GAT GGT AAA ATA CCA GAA GAC TTC TCC TTT AGT AAC TGG TTT TTA TTG TCA 900
 V P I D G K I P E D F S F S H W F L L S
 285 290 295 300
 GAT AAA TCC ACT TTG GTA CAA GGT CGT GTT CTT AGT AGT CAA CCA GTT TTT GTA CAA TGC 960
 D K S T L V Q G R V L S S Q P V F V Q C
 305 310 315 320
 CTT AGC CCT GTA CCA TCG TGG TCT AAC AAT ACG GCT GTC GTC CAT TTT AAA AAT GAT GCC 1020
 L R P V P S W S N N T A V V H F K N D A
 325 330 335 340
 TTC TGC CCT AAC GTC ACG GCA GAT GTT TTG AGG TTC AAT CTA AAT TTT AGT GAC ACT GAT 1080
 F C P N V T A D V L R F N L N F S D T D
 345 350 355 360
 GTC TAT ACA GAT TCA ACT AAT GAT GAA CAG TTG TTT TTT ACA TTT GAA GAT AAT ACA ACT 1140
 V Y T D S T N D E Q L F F T F E D N T F
 365 370 375 380
 GCC TCC ATA GCC TGT TAT AGC AGT GCC AAT GTC ACT GAT TTT CAG CCT GCA AAT AAT ACT 1200
 A S I A C Y S S A N V T D F Q P A N N S
 385 390 395 400

【図10】



【図2】

GTC TCT CAC ATT CCA TTT GGC AAA ACT GCG CAT TTC TGT TTT GCC AAT TTT TGT CAT TCA 1206
 V S H I P F G K T A H F C F A H F S H S
 405 410 415 420
 ATT GTG AGC AGA CAG TTT TTG GGC ATA CTT CCA CCA ACT GTT CGA GAG TTT GCA TTT GGC 1320
 I V S R Q F L G I L P P T V R E F A F G
 425 430 435 440
 AGA GAT GGA TGC ATT TTT GTC AAT GGC TAT AAA TAT TTT AGT TTA CCA GCT ATC AGG AGT 1380
 R D G S I F V W G Y K Y F S L P A I R S
 445 450 455 460
 GTT AAC TTC TCC ATC AGT TCA GTA GAG GAG TAT GGC TTT TGG ACC ATA GCC TAT ACT AAC 1440
 V M F S I S S V E E Y G F W T I A Y T N
 465 470 475 480
 TAT ACA GAT GTA ATG GTG GAT GTT AAT GGC ACA GCT ATT ACT AGG CTA TTC TAT TGT GAC 1500
 Y T D V M V D V N G T A I T R L F Y C D
 485 490 495 500
 TCG CCC CTC AAT AGA ATT AAG TGT CAA CAA TTA AAG CAT GAA TTG CCA GAC GGG TTT TAT 1560
 S P L N R I K C Q Q L K H E L P D G F Y
 505 510 515 520
 TCT GCT AGT ATG CTT GTT AAA AAG GAT TTA CCC AAA ACA TTT GTT ACC ATG CCA CAG TTT 1620
 S A S H L V K K D L P K T F V T M P Q F
 525 530 535 540
 TAC CAC TGG ATG AAT GTC ACG TTA CAT GTT GTA TTA AAT GAC ACA GAG AAA AAG TAT GAC 1680
 Y N W M H V T L H V V L N D T E K K Y D
 545 550 555 560
 ATC ATT CTC GCT AAA GCC CCT GAG CTA GCA GCA CTC GCG GAT GTA CAT TTT GAA ATA GCT 1740
 I I L A K A P E L A A L A D V H F E I A
 565 570 575 580
 CAG GCT AAC GCG AGT GTA ACT AAT GTT ACT AGC CTA TGT GTC CAA GCA AGA CAG TTG GCT 1800
 Q A M G S V T M V T S L C V Q A E Q L A
 585 590 595 600
 CTA TTT TAT AAG TAT ACT AGC TTA CAA GGT TTG TAT ACT TAT TCT AAC TTA GTG GAG CTA 1860
 L F Y K I T S L Q G L Y T Y S M L V E L
 605 610 615 620
 CAA AAT TAT GAC TCG CCC TTC TCA CCG CAG CAG TTT AAT AAT TAT TTG CAG TTT GAA ACT 1920
 Q N Y D C P F S P Q Q F N N Y L Q Y E T
 625 630 635 640
 TTA TGT TTT GAT GTG AAC CCT GCT GTG GCA GGT TGT AAG TGG TCG TTA GTT CAT GAT GTC 1980
 L C F D V N P A V A G C K W S L V H D V
 645 650 655 660
 CAG TGG CGT ACG CAG TTC GCC ACC ATT ACG GTT TGT TAT AAA CAT GGT TCT ATG ATC ACT 2040
 Q W R T Q F A T I T V S Y K H G S M I T
 665 670 675 680
 ACC CAT CCC AAG GCG CAC AGT TCG GGT TTT CAA GAT ACC TCT GTT TTG GTA AAA GAT GAA 2100
 T H A K G H S W G F Q D T S V L V K D E
 685 690 695 700
 TGT ACT GAC TAC AAT ATA TAT GGC TTT CAG GCG ACA GGC ATT ATT AGA AAC ACC ACC TCA 2160
 C T D Y N I Y G F Q G T G I I R N T T S
 705 710 715 720
 AGG TTA GTG GGT GGT CTT TAC TAC ACA TCT ATT AGT GGT GAC CTT CTA GCC TTT AAA AAT 2220
 R L V A G L Y Y T S I S G D L L A P K N
 725 730 735 740
 AGT ACT ACT GGT CAG ATT TTC ACT GTA GTG CCA TGT GAT CTA ACA GCA CAA GTA GCT GTG 2280
 S T T G E I F T V V P C D L T A Q V A V
 745 750 755 760
 ATT AAT GAT GAG ATA GTG GGA CCT ATA ACA GGC GTT AAT CAA ACT GAT GTG TTT GAG TTC 2340
 I M D E I V G A I T A V N Q T D L F E F
 765 770 775 780
 GTA AAT AAC ACA CAG GCG AGA AGA TCA CGT AGT TCA ACA CCA AAT TTT GTA ACA TCC TAT 2400
 V N N T Q A R R S R S S T P N F V T S Y
 785 790 795 800

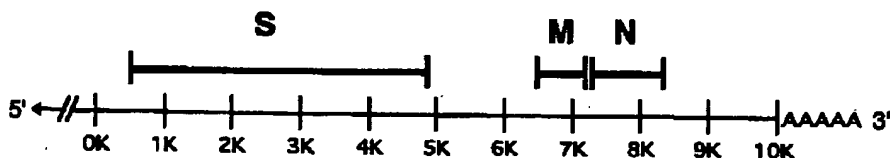
【図3】

ACT ATG CGA CAA TTT TAT TAC ATA ACA AAA TCG AAT AAT GAC ACA TCG TCC AAT TGT ACA 2460
 T M P Q F Y Y I T X W N N D T S S H C T
 805 810 815 820
 TCT GCC ATT ACC TAC TCC TCT TTT GCT ATT TGT AAT ACT GGT GAG ATT AAA TAT GTT AAT 2520
 S A I T Y S S P A I C N T G E I K Y V N
 825 830 835 840
 GTC ACT CAT GTT GAA ATT GTG GAT GAT AGT ATA GGC GTT ATT AAA CCT GTT TCA ACA GGT 2580
 V T H V E I V D D S I G V I K P V S T G
 845 850 855 860
 AAC ATA TCG ATA CCT AAA AAC TTC ACT GTC GCA GTA CAA GCT GAA TAC ATT CAG ATT CAA 2640
 N I S I P K N F T V A V Q A E Y I Q I Q
 865 870 875 880
 GTC AAA CCT GTT GTT GTG GAT TCT GCC AGC TAT GTT TGT AAT GGC AAT ACA CAT TCG CTC 2700
 V K P V V V D C A T Y V C N G N T H C L
 885 890 895 900
 AAA TTA CTA ACA CAA TAC ACC TCA GCT TGT CAG ACA ATT GAA AAT GCC CTT AAT CTT GGT 2760
 X L L T Q Y T S A C Q T I E N A L N L G
 905 910 915 920
 GCA CGT CTT GAA TCG TTA ATG CTT AAT GAT ATG ATT ACA GTA TCA GAT COT GGT TTG GAG 2820
 A R L E S L N L N D N I T V S D R G L E
 925 930 935 940
 CTT GCA ACT GTT GAA AGA TTC AAT GCC ACA GCT TTA GGT GGT GAA AAG CTA GGC GGT TTA 2880
 L A T V E R F N A Y A L G G E K L G G L
 945 950 955 960
 TAT TTT GAT GGC CTG AGC AGT CTA TTA CCG CCT AAA ATT GGT AAG AGG TCG GCT GTT GAA 2940
 Y F D G L S S L L P P K I G K R S A V E
 965 970 975 980
 GAT CTA TTG TTC AAT AAA GTG GTG ACC AGC GGT CTT GGC ACT GTT GAT GAT GAC TAT AAA 3000
 D L L F H K V V T S G L G T V D D D Y K
 985 990 995 1000
 AAG TGC TCT TCC GGC ACT GAC GTT GCA GAT CTA CTT TGT GCC CAA TAT TAC AAT GGC ATA 3060
 K C S S G T D V A D L V C A Q Y Y N G I
 1005 1010 1015 1020
 ATG GTT TTA CCT GGT GTT GTG GAT GGT AAT AAG ATG TCT ATG TAC ACT GCA TCT TTA ATT 3120
 M V L P G V V D G N K N S M Y T A S L I
 1025 1030 1035 1040
 GGC GGT ATG GCT TTG GGC TCT ATT ACA TCC GCT GTA GCT GTT CTT TTC GCC ATG CAA GTG 3180
 G G N A L G S I T S A V A V P F A M Q V
 1045 1050 1055 1060
 CAG GCG AGG CTT AAT TAT GTC GCA CTA CAA ACT GAT GTT TTG CAG GAG AAC CAA AAA ATA 3240
 Q A R L N I V A L Q T D V L Q E N Q K I
 1065 1070 1075 1080
 CTT GCT AAT GCC TTT AAT AAT GCC ATT GGT AAC ATT ACA CTA GCG CTT GCA AAA GTT TCT 3300
 L A N A F H N A I G M I T L A L G K V S
 1085 1090 1095 1100
 AAT GCT ATT ACA ACC ACA TCA GAT GGT TTT AAT AGT ATG GCC TCA GCA CTG ACT AAG ATC 3360
 N A I T T T S D G F N S M A S A L T K I
 1105 1110 1115 1120
 CAG AGT GTA GTC AAT CAA CAG GGT GAA GCG TTA ACT CAA CTT ACT AGT CAG TTA CAG AAG 3420
 Q S V V N Q Q G E A L S Q L T S Q L Q K
 1125 1130 1135 1140
 AAC TTT CAG GCT ATC AGC AGT TCC ATT GCT GAA ATT TAT AAT AGG CTG GAG AAG GTG GAA 3480
 N P Q A I S S S I A E I Y N R L E K V E
 1145 1150 1155 1160
 GCT GAT GCC CAA GTT GAC GGT CTC ATT ACT GGT AGA TTG GCA GCA CTT AAT GCT TAT GTG 3540
 A D A Q V D R L I T G R L A A L N A Y V
 1165 1170 1175 1180
 TCT CAA ACT CTA ACT CAG TAT GCT GAA GTC AAG GCC AGT AGG CAA ATT GCA TTG GAG AAA 3600
 S Q T L T Q Y A E V K A S R Q I A L E E
 1185 1190 1195 1200

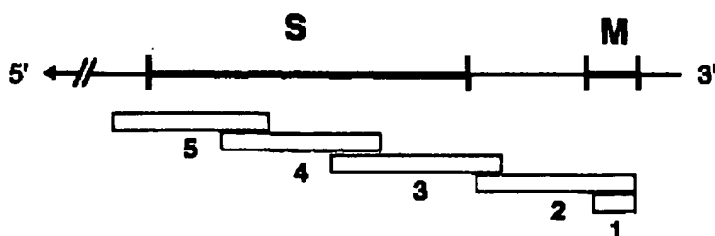
【図4】

GTT AAT GAG TGT GTG AAA TCA CAA TCG AAT AGG TAT GGC TTC TGT GGA AAT GGA ACA CAC 3660
 V N E C V K S Q S H R Y G F C G N G T H
 1205 1210 1215 1220
 CTA TTC TCA CTT GTC AAT TCA GCA CCT GAA GGT TTG CTT TTC TTT CAC ACA GTT TTA CTT 3720
 L F S L V N S A P E G L L F F H T V L L
 1225 1230 1235 1240
 CCT ACA GAA TGG GAA GAA GTG ACG GCA TGG TCA GGA ATA TGT GTT AAT GAT ACT TAT GCA 3780
 P T E W E E V T A W S G I C V N D T Y A
 1245 1250 1255 1260
 TAT GTG TTG AAA GAT TTT GAT CAT TCG AAT TTC AGC TAC AAT GGC ACG TAT ATG GTA ACT 3840
 Y V L N D F D H S I F S Y H G T Y M V T
 1265 1270 1275 1280
 CCT CGT AAG ATG TTT CAA CCT AGA AAG CCT CAG ATG AGT GAT TTC GTG CAA ATT ACG AGT 3900
 P R N M F Q P R K P Q M S D F V Q I T S
 1285 1290 1295 1300
 TGT GAA GTG ACT TTT TTG AAC ATG ACA TAT ACG ACA TTT CAG GAG ATT GTG ATC GAT TAT 3960
 C E V T F L N M F Y T F F Q E I V I D Y
 1305 1310 1315 1320
 ATT CAT ATT AAG ACT ATC GCT GAT ATG CTT GAA CAA TAC AAT CCT AAT TAC ACA ACT 4020
 I D I N K T I A D M L E Q Y N P H Y T T
 1325 1330 1335 1340
 CCT GAG CTA AAT CTA CTG CTG GAT ATC TTT AAT CAG ACA AAG TTA AAG CTC ACT GCA GAA 4080
 P E L N L L L D I F N Q T K L N L Y A E
 1345 1350 1355 1360
 ATA GAC CAA TTG GAA CAA AGA GCT GAC AAC CTC ACT ACT ATA GCA CAT GAG CTA CAG CAG 4140
 I D Q L E Q R A D N L T T I A H E L Q Q
 1365 1370 1375 1380
 TAC ATT GAC AAT CTT AAT AAG ACG CTT GTT GAC CTT GAC TGG CTC AAC AGG ATT GAA ACT 4200
 Y I D N L N K T L V D L D W L N R I E T
 1385 1390 1395 1400
 TAT CTA AAA TGG CCT TGG TAT GTG TGG TTA CTA ATA GGT TTA GTA GTA GTC TTC TGC ATA 4260
 Y V K N P W I V N L L I G L V V V F C I
 1405 1410 1415 1420
 CCA CTG TTA CTG TTT TGC TGT CTG AGT ACT GGT TTC TGT GGC TGT TTT GGT TGT GTT GGC 4320
 P L L L F C C L S T G F C G C F G C V G
 1425 1430 1435 1440
 AGT TGT TGT CAT TCT CTT TGT AGT AGA AAG CAA TTT GAA ACC TAT GAA CCC ATT GAA AAG 4380
 S C C H S L C G R R Q F E T Y E P I E K
 1445 1450 1455 1460
 GTT CAC ATT CAT
 V H I H

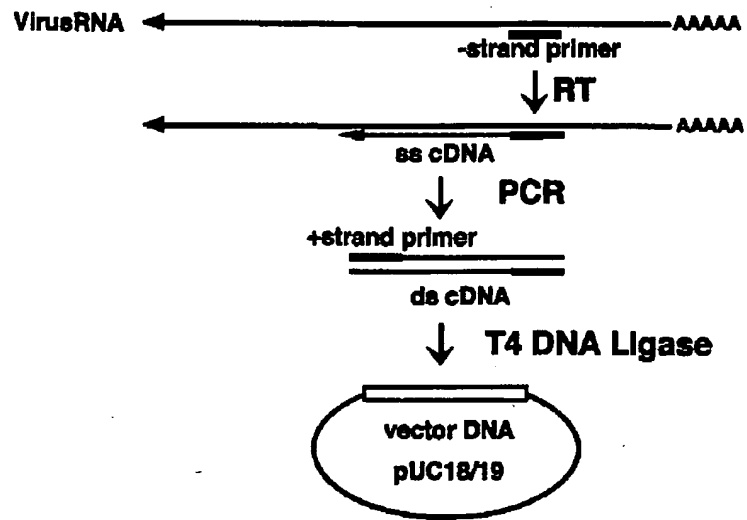
【図5】



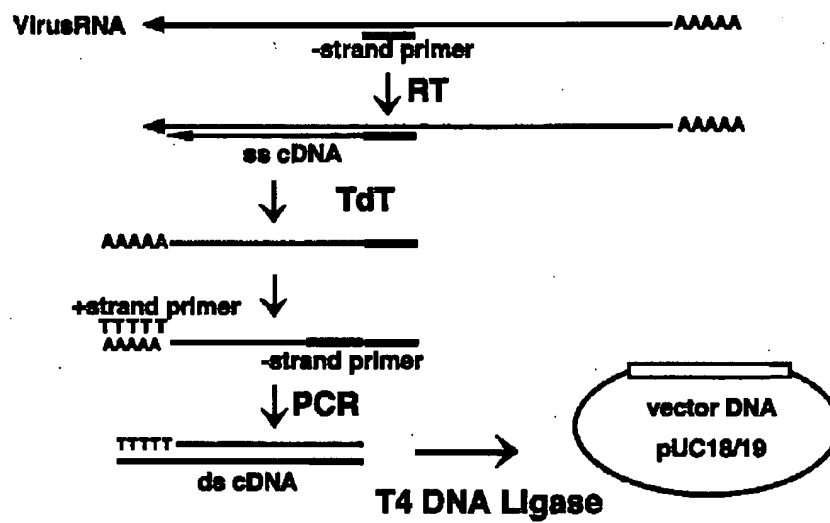
【図8】



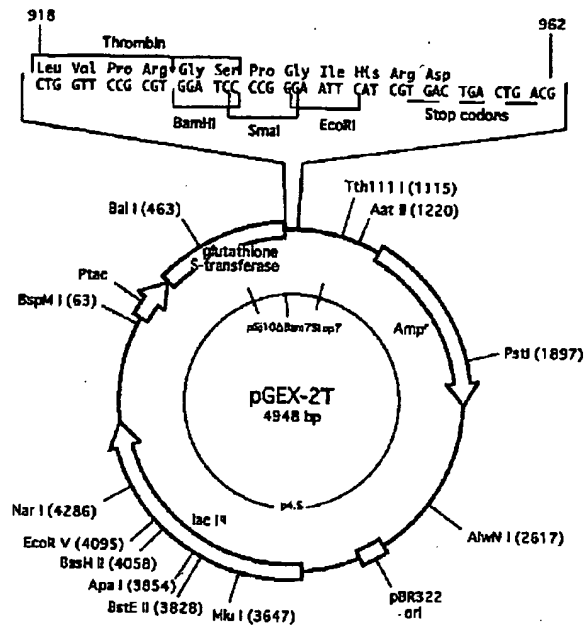
【図6】



【図7】



【図9】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 6

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

/(C 1 2 P 21/02

C 1 2 R 1:19)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.